

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors CCAAT/*Enhancer-Binding Protein*  
bei der Interleukin-10 Promotoraktivierung  
durch zyklisches Adenosinmonophosphat  
in Monozyten**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Susanne Brenner**

**geboren am 1. Februar 1979 in Suhl**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. Karl-Jürgen Halbhuber**, Institut für Anatomie der FSU Jena
- 2. PD Dr. Karl-Heinz Friedrich**, Institut für Biochemie der FSU Jena
- 3. PD Dr. Susanna Prösch**, Institut für Virologie der HUB, Charité Berlin

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**2. November 2004**

**Abkürzungsverzeichnis**

ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
bE	beliebige Einheiten
bp	<i>basepairs</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein</i>
CMV	<i>CytoMegaloVirus</i>
CRE	<i>cAMP Responsive Element</i>
CREB	<i>CRE Binding Protein</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GRE	<i>Glucocorticoid Responsive Element</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MSV	<i>Mouse Sarcoma Virus</i>
PK	Protein-Kinase
rpm	<i>rounds per minute</i>
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer of Activated Transcription</i>
TBP	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Factor

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2. 1. Zytokine und ihre Bedeutung im Immunsystem .....</b>	<b>7</b>
<b>2. 2. Interleukin-10 .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Die IL-10 Wirkungen .....	10
2.2.2. Die physiologische und klinische Bedeutung von IL-10.....	13
2.2.3. Das IL-10 Gen .....	15
2.2.4. Die Regulation der IL-10 Transkription.....	15
<b>2. 3. Die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie .....</b>	<b>19</b>
2.3.1. C/EBP in der cAMP/PKA-vermittelten Signaltransduktion .....	19
2.3.2. C/EBP-Expression und Zelldifferenzierung .....	20
<b>3. ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
<b>4. 1. Das MatInspector Professional Programm .....</b>	<b>23</b>
<b>4. 2. Electrophoretic Mobility Shift Assay .....</b>	<b>23</b>
<b>4. 3. Plasmide .....</b>	<b>24</b>
4.3.1. Reportergenplasmide .....	24
4.3.2. Expressionsplasmide.....	25
<b>4. 4. Arbeiten mit E.coli .....</b>	<b>26</b>
4.4.1. Herstellung kompetenter E.coli .....	26
4.4.2. Transformation und Kultur.....	26
<b>4. 5. DNA-Manipulationen und Analyse .....</b>	<b>27</b>
4.5.1. Mutagenese .....	27
4.5.2. Restriktionsspaltung .....	28
4.5.3. Dephosphorylierung .....	28
4.5.4. DNA-Ligation .....	28
4.5.5. Auffüllen eines 3'Überhangs und blunt-end-Ligation .....	29
4.5.6. Gelelektrophorese.....	29
4.5.7. Sequenzierung.....	29
<b>4. 6. DNA-Präparation.....</b>	<b>30</b>
4.6.1. DNA-Isolation aus Agarose-Gelen.....	30

4.6.2. Phenol/Chloroform-Präparation von Plasmiden .....	30
4.6.3. CsCl-Präparation von Plasmiden.....	30
4.6.4. Bestimmung und Einstellung von DNA-Konzentrationen.....	31
<b>4. 7. Arbeiten mit Zelllinien.....</b>	<b>31</b>
4.7.1. Zellkulturen.....	31
4.7.2. Transfektion von HL-60 und THP-1 Zellen .....	32
<b>4. 8. Luciferase-Reportergen-Assay .....</b>	<b>32</b>
<b>4. 9. Statistische Berechnung .....</b>	<b>33</b>
<b>5. ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
5. 1. Die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie binden an drei Motive der IL-10 Promotor/Enhancer-Region.....	34
5. 2. Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$ ist an der cAMP-induzierten IL-10 Promotoraktivierung in THP-1 Zellen beteiligt. ....	37
5. 3. Die Mutation der C/EBP-Motive 1, 3 und 5 in der IL-10 Promotor/Enhancer- Region.....	38
5. 4. Drei C/EBP-Motive sind in die cAMP-induzierte IL-10 Transkription in THP-1 Zellen involviert. ....	40
5. 5. Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$ ist an der konstitutiven IL-10 Promotoraktivität in THP-1 Zellen beteiligt. ....	42
5. 6. Die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$ und CREB sind zur konstitutiven und stimulierten IL-10 Promotoraktivierung notwendig. ....	43
5. 7. Die Herstellung der Mutante pGL-2AvrIImutC/EBP5 .....	45
5. 8. Die einzelnen C/EBP-Motive der IL-10 Promotor/Enhancer-Region haben unterschiedlichen Anteil an der IL-10 Transkription. ....	46
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
6. 1. Die Beteiligung von C/EBP an der monozytären IL-10 Transkription.....	49
6.1.1. Die C/EBP-Motive in der IL-10 Promotor/Enhancer-Region.....	49
6.1.2. Die funktionelle IL-10 Promotor/Enhancer-Struktur .....	50
6.1.3. C/EBP in der cAMP/PKA-abhängigen Aktivierung der IL-10 Transkription....	52
6.1.4. Die C/EBP-vermittelte konstitutive IL-10 Promotor/Enhancer-Aktivität.....	53
6. 2. Die Bedeutung von C/EBP in der differenzierungsabhängigen, zell-und gewebsspezifischen IL-10 Genregulation .....	53
6.2.1. Die Bedeutung der C/EBP-CREB-Interaktion bei Stress und Entzündung .....	55

6.2.2. Die Bedeutung der Interaktionen von C/EBP mit anderen Transkriptionsfaktoren bei Stress und Entzündung .....	57
<b>6. 3. Die IL-10 Therapie, ein Anlass zu Hoffnung? .....</b>	<b>59</b>
6.3.1. Die Bedeutung von Polymorphismen.....	59
6.3.2. Eine Bewertung direkter und indirekter IL-10 Therapieformen.....	60
<b>7. SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>63</b>
<b>8. QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>64</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>74</b>
9. 1. Danksagung .....	74
9. 2. Ehrenwörtliche Erklärung .....	75
9. 3. Lebenslauf.....	76

## **1. ZUSAMMENFASSUNG**

Zytokine spielen als lösliche Mediatoren der Zellkommunikation im Rahmen einer Immunantwort eine entscheidende Rolle. Sie modulieren das Immunsystem hinsichtlich Abwehr und Toleranz zum Schutz vor Fremdorganismen, Toxinen und maligner Entartung bei minimalen Gewebsschäden. Die Immunkompetenz des Organismus ist vom Gleichgewicht zwischen der pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort abhängig. IL-10 fungiert mit seinen anti-inflammatorischen, toleranz-induzierenden Eigenschaften als Immunmodulator und kann bei Überschuss oder Mangel pathophysiologische Bedeutung erlangen. Deshalb ist ein näheres Verständnis der Genregulation dieses Zytokins für Immunologen und Kliniker von Interesse.

- In Monozyten wird die IL-10 Transkription durch die cAMP-abhängige Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie aktiviert. Dabei sind zwei CRE-Motive in der IL-10 Promoter/*Enhancer* Region beteiligt.
- Die Mutation der CRE-Motive in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region reichte jedoch nicht aus, um die cAMP-induzierte IL-10 Transkription vollständig zu unterbinden, so dass andere beteiligte Motive vermutet werden mussten.
- Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die cAMP-Stimulierbarkeit des IL-10 Promotors mit dem Differenzierungsgrad und dem C/EBP-Gehalt in Monozyten zunimmt.

Das Ziel meiner Arbeit war zu klären, ob und in welchem Ausmaß der Transkriptionsfaktor C/EBP an der cAMP-vermittelten IL-10 Promotoraktivierung in Monozyten beteiligt ist.

- Im EMSA wurde die Bindung von C/EBP-Isoformen an drei Motive in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region nachgewiesen.
- Reporter-gen-Untersuchungen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  und seine Bindung an die drei C/EBP-Motive in die cAMP-abhängige und konstitutive IL-10 Transkription differenzierter Monozyten involviert ist.
- Durch die Mutation der einzelnen C/EBP-Motive wurde ihr Anteil an der IL-10 Transkription ermittelt und es stellte sich heraus, dass das TATA-Box nahe C/EBP5-Motiv eine essentielle Funktion hat.

- Bei der Substitution des Transkriptionsfaktors C/EBP $\alpha$  in undifferenzierten Monozyten konnte die IL-10 Transkription, wie in differenzierten Monozyten, durch cAMP stimuliert werden.
- Durch Koexpression einer CREB-Mutante wurde gezeigt, dass nicht nur die cAMP-stimulierte, sondern auch die C/EBP-vermittelte konstitutive IL-10 Transkription von einer CREB-Phosphorylierung abhängig ist.

Diese Ergebnisse liefern einen Beitrag zum Verständnis der IL-10 Promoter/*Enhancer*-Struktur einerseits sowie der differenzierungsabhängigen Genregulation andererseits.

- Auch wenn bisher eine Phosphorylierung von C/EBP durch die PKA nicht beschrieben wurde, ist eine direkte oder indirekte Interaktion von C/EBP mit phosphoryliertem CREB bei der Aktivierung der IL-10 Transkription wahrscheinlich.
- Da das C/EBP5-Motiv für die konstitutive und cAMP-stimulierte IL-10 Transkription essentiell war und nahe der TATA-Box lokalisiert ist, kann hier eine Interaktion mit dem basalen Transkriptionsfaktorkomplex vermutet werden.
- Am Beispiel der Monozyten wurde gezeigt, dass die Interaktion ubiquitärer Signaltransduktionsmechanismen mit akzessorischen Faktoren eine differenzierungsabhängige Genregulation ermöglicht. Es liegt nahe, dass ein Gen auf diese Weise auch gewebsspezifisch reguliert werden kann. Zum Beispiel werden verschiedene C/EBP-Isoformen in der Leber exprimiert und das Organ gilt als eine Hauptquelle der systemischen IL-10 Produktion.
- Durch die Kooperation mit dem cAMP-Signaltransduktionsweg ist C/EBP an der Stimulation der IL-10 Transkription über Rezeptoren, die die Adenylatzyklase aktivieren, beteiligt. Mediatoren, die solche Rezeptoren benutzen, werden sowohl bei Entzündung, als auch bei der hypothalamo-hypophysär-adrenergen Aktivierung freigesetzt und sprechen für eine Wechselwirkung zwischen dem Immun-, Hormon- und dem vegetativen Nervensystem bei der IL-10 Induktion. Demzufolge ist auch eine Interaktion von C/EBP mit den entsprechenden Signaltransduktionswegen denkbar.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte bei der Untersuchung der IL-10 Expression in anderen Zellen zukünftig deren C/EBP-Gehalt mit berücksichtigt werden. Im Zuge weiterführender Untersuchungen müssen Gewebe- und *in vivo*-Modelle in Betracht gezogen werden, um die komplexe Genregulation von IL-10 sowie anderer Faktoren und assoziierte pathophysiologische Mechanismen besser verstehen und daraus evtl. Therapieansätze ableiten zu können.

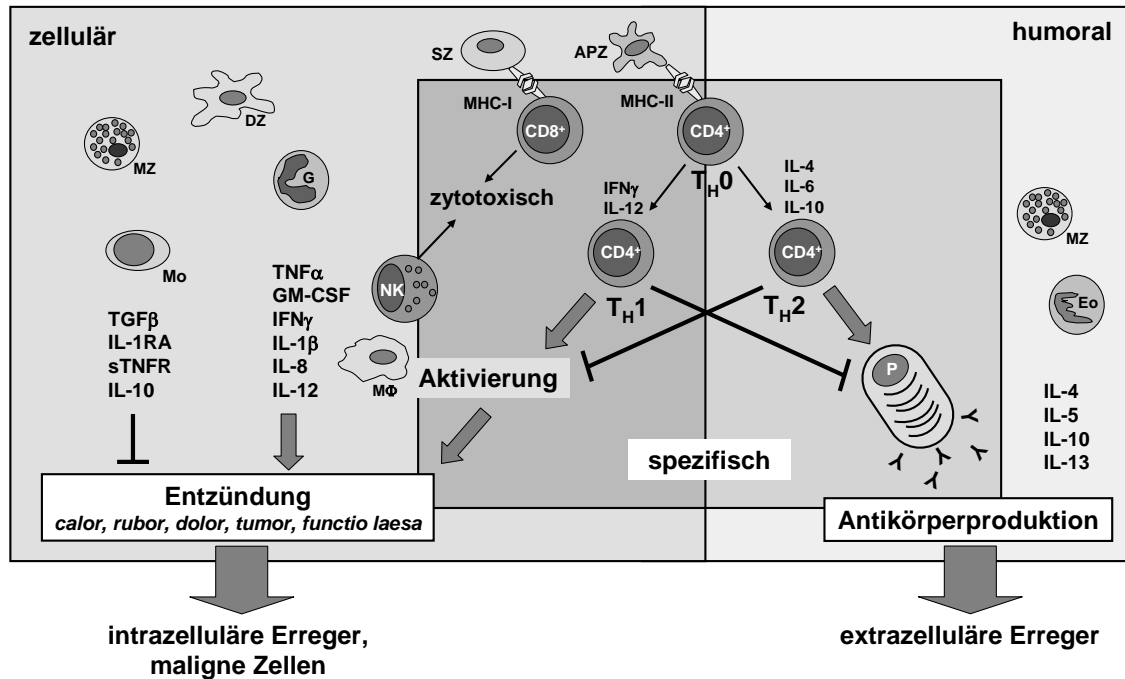


## **2. EINLEITUNG**

### **2. 1. Zytokine und ihre Bedeutung im Immunsystem**

Für die biologischen Funktionen eines Organismus ist die interzelluläre Kommunikation essentiell. Im Besonderen basieren das Immunsystem, das Blutbildungssystem und Teile des neuronalen Systems auf komplexen Zellinteraktionen, bei denen lösliche Faktoren als Botenstoffe fungieren. Handelt es sich dabei um Proteine, die von Zellen synthetisiert werden und wiederum das Verhalten anderer Zellen beeinflussen, werden sie als Zytokine bezeichnet. Zytokine sind kurzlebige Polypeptide geringer molekularer Masse, die nicht wie Hormone in Drüsen gespeichert, sondern schnell als Reaktion auf lokale hochspezifische Reize von unterschiedlichen Zellen synthetisiert und sezerniert werden können. Zur Gruppe der Zytokine gehören u. a. Interleukine, Lymphokine, Monokine, Interferone, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Interleukine, Lymphokine und Monokine sind Zytokine, die hauptsächlich von Leukozyten, Lymphozyten bzw. Monozyten produziert werden. Interferone sind Glykoproteine, die als IFN(Interferon) $\alpha$ ,  $\beta$ , oder  $\gamma$  von Leukozyten, Fibroblasten bzw. T-Lymphozyten nach Induktion durch virale Antigene gebildet werden und anti-virale Reaktionen anderer Zellen auslösen. Chemokine lenken das Migrationsverhalten ihrer Zielzellen und Wachstumsfaktoren regen die Proliferation und Reifung von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten oder Fibroblasten an. Zytokine wirken über spezifische Rezeptoren auf viele Zelltypen, also pleiotrop und in nano- bzw. pikomolaren Konzentrationsbereichen. Sie beeinflussen die DNA-, RNA- oder Proteinsynthese der Zielzellen. Sie haben oft redundante, das heißt sich überlagernde Wirkungsspektren und koordinieren bzw. modulieren vor allem die Reaktionen des Immunsystems.

Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution an der Entwicklung eines hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrsystems gearbeitet, welches den Organismus vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen sowie malignen Zellen schützt, Gewebsschäden minimiert, jedoch lokal Symbionten toleriert. Immunologische Abwehrreaktionen werden durch regulatorische Mechanismen moduliert. Eine entscheidende Rolle kommt dabei dem Einfluss der Zytokine zu.



**Abb. 1: Beteiligte Zellen und Mediatoren bei der entzündlichen zellulären bzw. der humoralen Immunreaktion.** APZ, antigen-präsentierende Zelle; DZ, dendritische Zelle; Eo, eosinophiler Granulozyt; G, Granulozyt; IL-1RA, IL-1 Rezeptorantagonist; Mo, Monozyt; MΦ, Makrophage; MZ, Mastzelle; NK, natürliche Killerzelle; P, Plasmazelle; SZ, somatische Zelle; sTNFR, löslicher TNF Rezeptor; Y, Antikörper.

Bei einer Infektion werden Makrophagen und Granulozyten sowohl durch Komplementspaltprodukte, als auch durch konservierte mikrobielle Oberflächenstrukturen wie LPS (Lipopolysaccharid) aktiviert und setzen in Folge dessen verschiedene Zytokine frei. Durch das komplexe Zusammenspiel zellulärer und humoraler Komponenten kommt es zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion (Abb. 1). Traditionell definiert sich die Entzündung oder Inflammation durch die fünf lateinischen Begriffe: *rubor, calor, tumor, dolor* und *functio laesa*. Sie bedeuten Rötung, Erwärmung, Schwellung, Schmerz und Funktionseinschränkung, beschreiben die fünf Kardinalsymptome einer Entzündung und reflektieren im weiteren Sinne die Wirkung von Zytokinen am Infektionsort. Durch Zytokine werden die Blutgefäße erweitert, ihre Permeabilität erhöht und dadurch Durchblutung und Plasmastrom in das Interstitium verstärkt. Das Gewebe rötet sich, erwärmt sich und schwillt an. Das Zytokin TNF(Tumor-Nekrose-Faktor)α besitzt neben vasodilatatorischen und gefäßpermeabilisierenden, starke endothelzell-aktivierende Eigenschaften. Aktivierte Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle, die das Anheften und Austreten von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten aus der Blutzirkulation in das Gewebe ermöglichen. Zirkulierende Leukozyten, die u. a. durch das Chemokin IL(Interleukin)-8 angelockt werden, migrieren zum Infektionsort. Durch Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor*) werden sie zur Proliferation angeregt.

Durch IL-1 und IL-12 werden das Monozyten/Makrophagensystem und natürliche Killerzellen aktiviert. Die resultierende lokale Konzentration aggressiver Abwehrkräfte führt zu Schwellung, Schmerz und Funktionseinschränkung durch Schäden im betroffenen Gewebe. Zum Schutz wird eine Gegenregulation ebenfalls durch Zytokine eingeleitet. Zur Abschwächung und schließlich zur Begrenzung der Entzündungsreaktion werden anti-inflammatorisch wirkende Zytokine und Mediatoren wie der IL-1 Rezeptorantagonist, TGF(*Transforming Growth Factor*) $\beta$  und IL-10 freigesetzt. Gleichzeitig werden die Rezeptoren entzündlicher Mediatoren wie z.B. für TNF moduliert bzw. abgeschert.

Antigene aktivieren schließlich die spezifische, klonale Immunabwehr. Auch hier spielen Zytokine eine entscheidende Rolle. Durch Antigenpräsentation aktivierte T-Lymphozyten sezernieren IL-2 und exprimieren gleichzeitig den entsprechenden Rezeptor, wodurch sie autokrin ihre Proliferation und Differenzierung auslösen. Somatische Zellen präsentieren ihre Antigene den CD(*Cluster of Differentiation*) $8^+$ T-Lymphozyten über den MHC(*Major Histocompatibility Complex*)-I (Abb. 1). Antigene virus-infizierter oder maligner Zellen aktivieren dabei die CD $8^+$ T-Lymphozyten, die darauf hin zytotoxisches Potential entwickeln und die Apoptose ihrer Zielzellen durch DNA-Fragmentation induzieren. Gleichzeitig sezernieren aktivierte CD $8^+$ T-Lymphozyten IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und  $\beta$ , wodurch die Virusreplikation gehemmt, die MHC-Expression verstärkt und die Makrophagen aktiviert werden. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten sind professionelle antigen-präsentierende Zellen, die Fremdantigene über MHC-II den CD $4^+$ T-Lymphozyten präsentieren (Abb. 1). Die CD $4^+$ T-Lymphozyten werden aktiviert und aus naiven T-Helfer-Zellen ( $T_H0$ ) werden  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zellen. Die Differenzierung zu einer der beiden CD $4^+$ Subpopulation wird vom Antigen sowie dem Zytokinmilieu beeinflusst. IFN $\gamma$  und IL-12 begünstigen eine  $T_H1$ -, dagegen IL-4, IL-6 und IL-10 die  $T_H2$ -Differenzierung. Diese CD $4^+$ Subpopulationen exprimieren ihrerseits wiederum unterschiedliche, jedoch überlappende Zytokinmuster, die die Immunreaktion in unterschiedliche Richtungen steuern.  $T_H1$ -Zellen produzieren Zytokine wie IL-2, IL-3, GM-CSF, das monozyten-chemotaktische Protein, TNF $\alpha$  und  $\beta$  sowie INF $\gamma$  zur Proliferation und Reifung von T-Zellen und zur Differenzierung, Akkumulation, Diapedese und Aktivierung von Makrophagen. Die  $T_H1$ -Zytokine haben ein vorwiegend pro-inflammatorisches Wirkungsspektrum und verstärken die Entzündungsreaktion. Gleichzeitig hemmen sie die B-Zell-Reaktion, die dagegen von den Zytokinen der  $T_H2$ -Subpopulation unterstützt wird. Die  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 induzieren die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu antikörper-produzierenden Plasmazellen. Gleichzeitig wird die Aktivierung von Makrophagen

gehemmt. Die hauptsächlich pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine der  $T_H1$ -Zellen aktivieren die Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene. Im Gegensatz dazu wird die humorale Immunantwort, die sich gegen extrazelluläre Pathogene richtet, von  $T_H2$ -Zytokinen mit vorwiegend anti-inflammatorischen Wirkungen stimuliert. Diese Betrachtungsweise ist jedoch vereinfachend, da es während einer Immunreaktion immer zu einer Aktivierung beider  $CD4^+$  Subpopulationen kommt (Janeway et al. 1999).

Durch die Koexistenz von gegensätzlich wirkenden, also pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen kann das Immunsystem seinen komplexen Aufgaben gerecht werden. Die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine wird im Laufe einer Immunreaktion von der anti-inflammatorischer abgelöst. Dadurch können pathogene Erreger bekämpft und gleichzeitig weitreichende Gewebsschäden vermieden werden. Die Immunkompetenz eines Organismus ist vom Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischer, zellulärer und humoraler Immunantwort abhängig.

## **2. 2. Interleukin-10**

Mitte der 80er Jahre wurden die  $CD4^+$  Subpopulationen  $T_H1$  und  $T_H2$  anhand ihrer unterschiedlichen Zytokinexpressionsmuster im murinen (Mosmann et al. 1986) und später auch im humanen Immunsystem (Del Prete et al. 1991) beschrieben. 1989 wurde ein  $T_H2$ -Faktor entdeckt, welcher die Zytokinsynthese in Monozyten und  $T_H1$ -Zellen hemmt. Später wurde er als IL-10 bezeichnet (Fiorentino et al. 1989, Hsu et al. 1990, Del Prete et al. 1991, Vieira et al. 1991). Aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften zieht dieses Zytokin seit seiner Entdeckung das Interesse der Immunologen auf sich. Es wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, aber auch von T- und B-Zellen sowie Keratinozyten produziert.

Das Monomer besteht aus 160 Aminosäuren, die sich sekundär zu 60% in  $\alpha$ -Helices konfigurieren. Für die tertiäre Strukturstabilität sowie die biologische Aktivität sind zwei Disulfid-Brücken relevant. In Lösung bildet das 18-20 kDa Protein ein 37 kDa Homodimer (Zdanov et al. 1995).

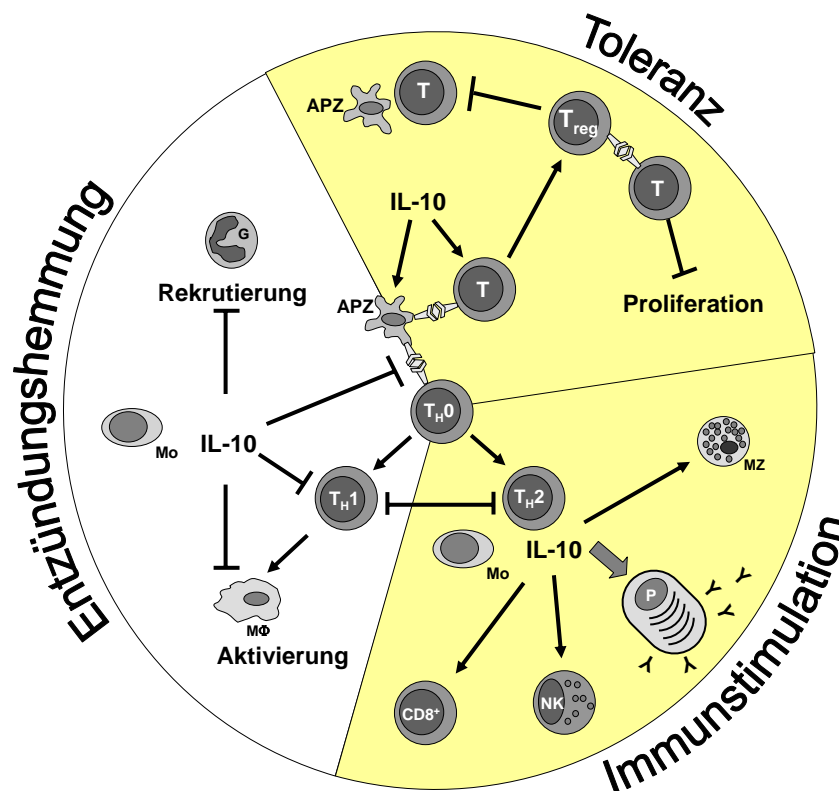
### **2.2.1. Die IL-10 Wirkungen**

Das IL-10 entfaltet seine intrazellulären Wirkungen über den IL-10 Rezeptor, der sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt. Die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors sind konstitutiv mit einer Janus- bzw. einer Tyrosin-Kinase assoziiert und gemeinsam aktivieren die STAT(*Signal Transducer of Activated Transcription*)3 Signaltransduktion. Sie vermitteln die liganden-abhängige Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 3) (Moore et al. 2001).

Phosphoryliertes STAT3 aktiviert die Expression von SOCS(*Suppressor Of Cytokine Signaling*)3 und dadurch wird die intrazelluläre Signaltransduktion vieler pro-inflammatorischer Zytokine verhindert. (Cassatella et al. 1999). Des weiteren interferiert die STAT3 Phosphorylierung mit der Aktivierung von STAT1 und es kommt intrazellulär zur Konkurrenz zwischen IL-10-vermittelter und pro-inflammatorischer, IFN $\gamma$ -aktivierter Signaltransduktion (Ito et al. 1999). Durch IL-10 wird darüber hinaus die I $\kappa$ B-Kinase und damit die Freisetzung und Translokation des pro-inflammatorischen Heterodimers p50/p65 in den Kern gehemmt. (Lentsch et al. 1997, Schottelius et al. 1999). Die Translokation des Homodimers p50/p50 als Konkurrent um die DNA-Bindungsstelle wird dagegen induziert (Asadullah et al. 2003). IL-10 inhibiert direkt und indirekt die Produktion bzw. Wirkung der meisten pro-inflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und GM-CSF (Moore et al. 2001). Dadurch wird die Rekrutierung und Aktivierung des Monozyten/Makrophagensystems, der natürlichen Killerzellen und der Granulozyten gehemmt. Zusätzlich wird die Bildung anderer anti-inflammatorischer Zytokine, wie die von TGF $\beta$  und von löslichen TNF-Rezeptoren, durch IL-10 stimuliert. IL-10 stabilisiert zusätzlich das Transkript des IL-1 Rezeptorantagonisten (Cassatella et al. 1994, Kishore et al. 1999, Denys et al. 2002, Asadullah et al. 2003) und verhindert die Entstehung anderer Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin E $_2$  und Stickoxid. Darüber hinaus wirkt IL-10 direkt stabilisierend auf die extrazelluläre Matrix, indem es Matrix-Metalloproteinasen hemmt und ihre Inhibitoren aktiviert. (Lacraz et al. 1995, Niirio et al. 1995, Haddad and Fahlman 2002). Auf der T $_H$ -Zellebene hemmt IL-10 die Differenzierung zu T $_H$ 1-Zellen. Auf diese Weise limitiert IL-10 sowohl die Dauer als auch die Intensität der entzündlichen Immunreaktion und kann somit irreversible Gewebsschäden verhindern. Die Fähigkeit zur Hemmung pro-inflammatorischer Prozesse auf unterschiedlichen Ebenen macht IL-10 zu einem potenten anti-inflammatorischen Zytokin (Abb. 2).

Neben anti-inflammatorischen Eigenschaften hat IL-10 jedoch auch immunstimulatorisches Potential. Als Induktor der T $_H$ 2-Differenzierung wird die B-Zell-assoziierte Immunreaktion von IL-10 unterstützt. Es fungiert hier als Kofaktor für anti-IgM- oder CD40-crosslinking-induziertes Wachstum und Differenzierung von B-Zellen (Abb. 2).

In der Literatur ist beschrieben, dass IL-10 auch die Proliferation, Differenzierung bzw. Zytotoxizität von CD8 $^+$ T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Mastzellen unterstützt (Chen and Zlotnik 1991, Lin T. J. and Befus 1997, Cavaillon 2001). Im Einzelnen ist die resultierende IL-10 Wirkung von seiner Konzentration, dem auslösenden Stimulus, der Zielzelle, dem zeitlichen Ablauf und nicht zuletzt dem experimentellen Modell abhängig.



**Abb. 2: Wirkungskreis von IL-10 bei der Immunreaktion.** Ausgefüllte Kreissegmente geben Verstärkung und das farblose Kreissegment Hemmung durch IL-10-Wirkung an. APZ, antigen-präsentierende Zelle; G, Granulozyt; Mo, Monozyt; MZ, Mastzelle; MΦ, Makrophage; NK, natürliche Killerzelle; P, Plasmazelle; T, T-Lymphozyt; T<sub>reg</sub>, regulatorische T-Zelle.

Ohne Zweifel ist IL-10 an der Induktion und Erhaltung der peripheren Immuntoleranz beteiligt. Die antigen-abhängige Aktivierung von T-Zellen wird durch IL-10 stark beeinträchtigt, denn IL-10 hemmt die Expression wichtiger Oberflächenmoleküle auf potentiellen antigen-präsentierenden Zellen (de Waal Malefyt et al. 1991, Willems et al. 1994, Buelens et al. 1995, Koppelman et al. 1997, Moore et al. 2001). Ohne MHC kann das Antigen nicht präsentiert werden und ohne Kostimulation durch CD80/86 wird die T-Zelle nicht aktiviert. Es resultiert eine T-Zell-Anergie, das heißt die T-Zellen reagieren nicht auf das Antigen. Reversibel anergisierte T-Zellen verhindern die Proliferation von T-Zellen derselben Antigenspezifität durch Zell-Zell-Kontakte und werden als regulatorische T-Zellen bezeichnet (Abb. 2). Die Vorbehandlung von antigen-präsentierenden dendritischen Zellen mit IL-10 bewirkt eine irreversible T-Zell-Anergie (Groux et al. 1996, Steinbrink et al. 2002). Irreversibel regulatorische T-Zellen können sowohl T-Zellen als auch antigen-präsentierende

Zellen durch immunsuppressive Zytokine inhibieren und eine Differenzierung von  $T_H0$ - in regulatorische T-Zellen induzieren (Abb. 2) (Roncarolo et al. 2001a, Roncarolo et al. 2001b).

### 2.2.2. Die physiologische und klinische Bedeutung von IL-10

IL-10 ist mit seinen anti-inflammatorischen, immunstimulatorischen und toleranz-induzierenden Eigenschaften ein physiologischer Modulator des Immunsystems. Ein Überschuss bzw. Mangel von IL-10 kann jedoch pathophysiologische Bedeutung haben.

Die immuntolerante Wirkung des IL-10 kommt eindrucksvoll während der Schwangerschaft an der plazentaren Mutter-Kind-Grenze zum Tragen. Hier hat das mütterliche Blut direkten Kontakt mit den, wenn auch unreifen Allogenen des ungeborenen Kindes, so dass sich eigentlich eine Abstoßungsreaktion ereignen müsste. Ein lokales  $T_H2$ -gewichtetes, immunsuppressives Mikromilieu scheint dies zu verhindern. An der Etablierung dieser immuntoleranten Umgebung ist u. a. die IL-10 Produktion der Deziduazellen beteiligt. Vor diesem Hintergrund wird vermutet, dass ein Teil der unklaren rekurrenten Aborte im ersten Schwangerschaftstrimenon auf eine unzureichende Immuntoleranz seitens der Mutter zurückzuführen ist. Bei Mäusen kann die Abstoßung des allogenen Feten durch intraperitoneale IL-10 Injektionen verhindert werden (Piccinni et al. 2000). Dieser Zusammenhang zeigt, dass IL-10 für die Transplantationsmedizin als Toleranzinduktor von Interesse ist (Bromberg 1995). Postoperativ erhöhte IL-10 Werte sind mit einer guten Transplantatakzeptanz assoziiert (Minguela et al. 1999).

Eine physiologische, IL-10-vermittelte Immuntoleranz ist außerdem für den Verdauungstrakt relevant, wo eine Koexistenz von prokaryontischen Symbionten sowie benigne Antigene der Nahrung geduldet werden sollen. Dies bestätigten vor allem die Beobachtungen an der IL-10-„Knockout“-Maus, die das klinische Bild einer chronischen Darmentzündung entwickelt, welches unter IL-10 Gabe rückläufig ist (Rennick and Fort 2000). Daraufhin vermutete man, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Kolitis Ulzerosa auf einen absoluten oder funktionellen IL-10 Mangel zurückzuführen sind.

Auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen könnte IL-10-Mangel eine Bedeutung haben, auch wenn sie bei der IL-10-„Knockout“-Maus nicht beobachtet wurden. Die rheumatoide Arthritis besteht in der chronischen Entzündung von Gelenken, die mit Synovialzell-Proliferation und Knorpeldestruktion einhergeht. Hier liegt ein pathologisches Überwiegen der  $T_H1$ -Immunantwort vor. Die Hauterkrankung Psoriasis ist die Folge einer kutanen  $T_H1$ -Reaktion, die sich in einer Entzündung der Haut und kompensatorisch verstärkter epidermaler Proliferation äußert. Pro-inflammatorische Zytokine führen zur

Makrophagen-Aktivierung, Granulozyten-Aggregation und Keratinozyten-Hyperproliferation. Sowohl bei der rheumatoiden Arthritis als auch bei Psoriasis kann aufgrund der verstärkten Aktivität entzündlicher Mediatoren von einem relativen IL-10 Mangel ausgegangen werden (Platzer 2003).

Der systemische Lupus erythematoses ist ein Beispiel für eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch eine verstärkte  $T_H2$ -Immunreaktion mit polyklonaler B-Zell-Aktivierung, hohem Serumantikörpertiter und glomerulärer Ablagerung von Immunkomplexen charakterisiert ist. B-Zellen und Makrophagen von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses zeigen *in vitro* eine verstärkte IL-10 Produktion. Verschiedene Studien haben ergeben, dass die Serumkonzentrationen von IL-10 mit dem Erkrankungsgrad korrelieren (Llorente et al. 1997, Liu and Jones 1998a, 1998b). Die Stimulation der Antikörperproduktion von B-Zellen durch IL-10 scheint eine wesentliche Rolle bei diesem Krankheitsbild zu spielen. Speziell  $CD5^+$ B-Zellen in einem Lupusmodell der Maus oder in einigen B-Zelllymphomen produzieren verstärkt IL-10 als autokrinen Wachstums- und Differenzierungsfaktor, der Apoptoseresistenz vermitteln kann (Levy and Brouet 1994).

Nicht nur bei einem chronischen Ungleichgewicht des Immunsystems, sondern auch bei akuter immunologischer Entgleisung spielt IL-10 eine Rolle. Anfang der 90er Jahre wurde zum ersten Mal das Phänomen der Immunparalyse bei einer größeren Patientengruppe mit Sepsis beschrieben. Paraklinisch ist die Immundepression durch eine verminderte Expression humaner Leukozyten-Antigene und  $TNF\alpha$  einerseits und durch eine verstärkte Produktion von IL-10 und dem IL-1 Rezeptorantagonisten andererseits charakterisiert (Baehr et al. 1989, Kox et al. 2000). Ein solcher Immunstatus wird als Kompensation einer vorangegangenen Hyperinflammation im Rahmen der septischen Infektion verstanden. Daraus ergibt sich das Zwei-Phasen-Konzept für den Verlauf einer Sepsis (Bone 1996). In beiden Phasen kann es zum Multiorganversagen und somit zum letalen Ausgang kommen. Für die Wahl einer erfolgreichen Therapie ist ein Immun-Monitoring unumgänglich, da beim systemischen Entzündungssyndrom eine anti-inflammatorische Behandlung und dagegen beim systemisch anti-entzündlichen Syndrom eine Immunstimulation lebensrettend sein kann.

Zusammenfassend wird deutlich, dass sowohl eine erhöhte als auch eine verminderte IL-10 Produktion maßgeblichen pathogenetischen Einfluss auf das immunologische Gleichgewicht zwischen Abwehr und Toleranz nehmen kann. Demzufolge ist die intensive Erforschung der Regulation der IL-10 Produktion sowohl für das Verständnis von Krankheiten als auch für die Entwicklung von Therapien unumgänglich.



### **2.2.3. Das IL-10 Gen**

1995 wurde ein 8868 bp (*basepairs*) langer Abschnitt, der das IL-10 Gen enthält, sequenziert und als GenBank<sup>™</sup>-Eintrag mit der *Accession Number* U16720 abgelegt. Das IL-10 Gen besteht aus 5 Exons und 4 Introns. Es liegt im humanen Genom auf dem Chromosom 1q32, im *cluster* der IL-10 Zytokinfamilie zusammen mit den Genen für IL-19, IL-20 und IL-24 (Fickenscher et al. 2002). Diese Zytokine sowie IL-22 und IL-26 haben mit IL-10 20-80% der Aminosäuresequenz gemeinsam und zur Zeit wird viel Arbeit in den Vergleich ihrer biologischen Aktivitäten investiert. Bei der Klonierung der humanen IL-10 cDNA fiel eine Sequenzhomologie von 83% zu dem Epstein-Barr-Virus-Gen BCRF1 mit ähnlicher biologischer Aktivität auf (Hsu et al. 1990, Vieira et al. 1991). Inzwischen wurden weitere Homologe in Herpes- und Poxviren gefunden. Diese IL-10 Korrelate kodieren homologe Proteine mit vergleichbaren Eigenschaften, die den gleichen Rezeptor verwenden und ein ähnliches Wirkungsspektrum haben wie das zelluläre IL-10 (Fickenscher et al. 2002). Sie stammen offenbar aus Wirtsgenomen und wurden im Zuge der Virusevolution in großen Teilen konserviert. Dieses Phänomen der Konservierung der IL-10 Sequenz in viralen Genomen unterstreicht seine biologische Relevanz bei der Modulation der Immunabwehr.

### **2.2.4. Die Regulation der IL-10 Transkription**

Die Expression eines Proteins wird post-translational durch Proteinmodifikation, post-transkriptional über die mRNA-Stabilität und auf der Ebene der Transkription, also beim Erstellen des RNA-Transkriptes reguliert. Verantwortlich für letzteres ist u. a. der 5' regulatorische Bereich eines Gens, der auch als Promotor/*Enhancer*-Region bezeichnet wird. Der Promotor entspricht der Bindungsdomäne für den Initiationskomplex der Transkription und der *Enhancer* enthält Bindungsstellen für zusätzliche Transkriptionsfaktoren.

Bereits 1993, vor der Sequenzierung des IL-10 Gens, wurden 1308 bp stromaufwärts des IL-10 Translationsstartpunktes kloniert, sequenziert und als GenBank<sup>™</sup>-Eintrag mit der *Accession Number* Z301275 abgelegt. (Platzer et al. 1994). Im Gegensatz zu anderen Zytokinen sind die Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren sowie die Elemente der Promotor/*Enhancer*-Region, die an der Expressionsregulation des humanen IL-10 Gens beteiligt sind, noch weitgehend unbekannt. Die Kenntnis der IL-10 Transkriptionsregulation kann zum Verständnis und zur Entwicklung neuer Konzepte der therapeutischen Manipulation der endogenen Expression von IL-10 bei Erkrankungen mit gestörtem immunologischem Gleichgewicht beitragen.

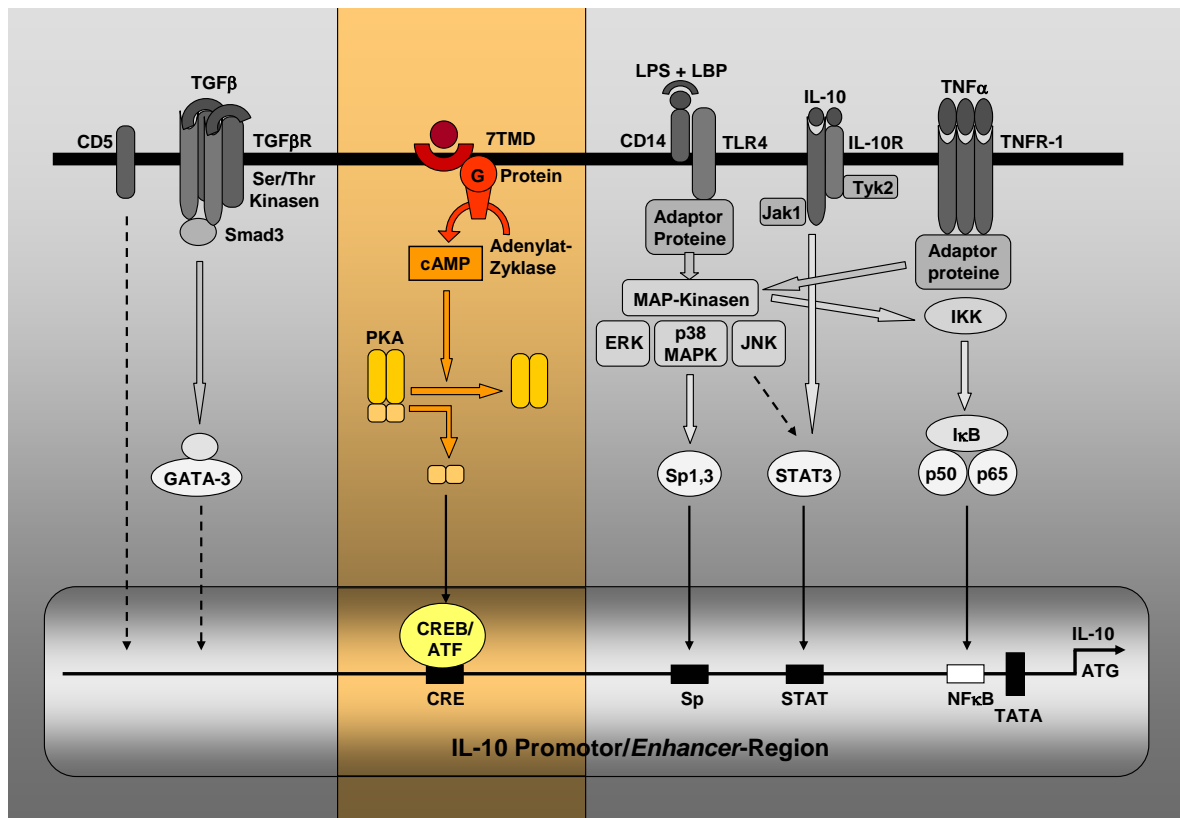
Es ist bekannt, dass die IL-10 Expression durch negative Rückkopplung über den IL-10 Rezeptor und die STAT3-Phosphorylierung gehemmt wird. STAT3-defiziente Mäuse produzieren verstärkt IL-10 nach Endotoxin-Stimulation (Takeda et al. 1999). Ungeachtet dessen konnte die Arbeitsgruppe von Ziegler-Heitbrock ein STAT3-spezifisches Motiv 154 bp stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription identifizieren, welches an der LPS-induzierten Expression des IL-10 in humanen B-Zellen beteiligt ist (Benkhart et al. 2000) (Abb. 3). Als inflammatorischer Stimulus kann LPS über CD14 die Expression nahezu aller Monokine induzieren. Durch Assoziation von CD14 mit dem *toll-like* Rezeptor kommt es zur Aktivierung von MAP(*Mitogen Activated Protein*)-Kinasen, die diverse Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. In Monozyten wurde eine Beteiligung der p38 MAP-Kinase sowie des Transkriptionsfaktors Sp1 an der LPS-induzierten IL-10 Transkription nachgewiesen (Ma et al. 2001) (Abb. 3). Dabei bindet Sp1 an ein Motiv 631 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. An der murinen IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region wurde ebenfalls Sp1 als Komponente der entzündlichen Transaktivierung identifiziert (Brightbill et al. 2000, Tone et al. 2000).

In B-Zellen ist die IL-10 Produktion mit der Expression von CD5 assoziiert. In einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD5 den IL-10 Promotor/*Enhancer* aktiviert, wobei der zugrunde liegende molekulare Mechanismus sowie beteiligte Transkriptionsfaktoren und Bindungsmotive bisher unbekannt sind (Abb. 3) (Gary-Gouy et al. 2002).

Die IL-10 Induktion durch das anti-inflammatorische Zytokin TGF $\beta$  ist noch nicht aufgeklärt. Wahrscheinlich bildet Smad3, was durch die intrinsischen Serin/Threonin-Kinasen des TGF $\beta$ -Rezeptors phosphoryliert wird, gemeinsam mit GATA-3 einen IL-10-induzierenden Komplex in T<sub>H</sub>2-Zellen (Abb. 3) (Blokzijl et al. 2002). Es ist bekannt, dass GATA-3 ein essentieller Transkriptionsfaktor für die T<sub>H</sub>2-Differenzierung ist, jedoch wurde eine entsprechende Bindungsstelle in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region bisher nicht identifiziert (O'Garra and Arai 2000).

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  ist an der *de novo* und LPS-induzierten IL-10 Transkription in Monozyten *in vivo* und *in vitro* beteiligt (Barsig et al. 1995, Platzer et al. 1995, Bondeson et al. 1999). Es kommt durch TNF-rezeptor-assoziierte Adaptorproteine bzw. LPS-aktivierte MAP-Kinasen zur Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Kinase. Dadurch dissoziiert der I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B-Komplex und das Dimer p50/p65 transloziert in den Kern. Die Bindung von NF $\kappa$ B in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region konnte zwar nachgewiesen werden, jedoch

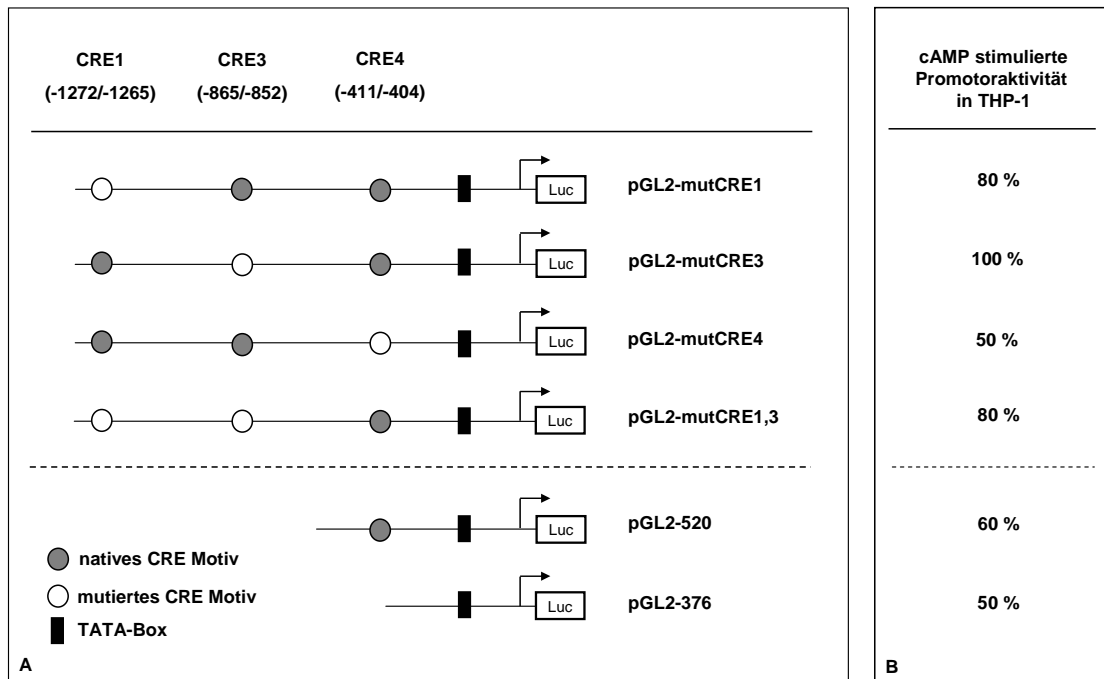
liegen derzeit keine Daten aus Funktionsanalysen vor (Abb. 3) (Mori and Prager 1997, Bondeson et al. 1999).



**Abb. 3: Übersicht der Signaltransduktionsmechanismen, die an der IL-10 Transkription beteiligt sind** (nach Platzter 2003). Gestrichelte Pfeile stehen für hypothetische, während durchgängige Pfeile bereits bestätigte Beziehungen angeben. Weiße Rechtecke entsprechen bereits bekannten TFBS, für die jedoch keine funktionellen Analysen vorliegen. Schwarze Rechtecke symbolisieren TFBS, die bereits funktionell getestet wurden. ERK, *extracellular signal regulated kinase*; IKK, *IκB-Kinase*; Jak, *Janus-Kinase*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; LPB, *LPS-bindendes Protein*; R, *Rezeptor*; Ser/Thr, *Serin/Threonin*; Sp, *stimulating protein*; TLR, *toll-like Rezeptor*; TMR, *Transmembrandomänen*; Tyk, *Tyrosin-Kinase*.

Paradoxerweise wurde eine Verstärkung der LPS-induzierten IL-10 Produktion in Kulturen peripherer mononukleärer Blutzellen beobachtet, wenn TNF $\alpha$ -inhibierende Substanzen, wie der Phosphodiesterasehemmer Pentoxifyllin, das Prostazyklinanalogon Iloprost oder der Entzündungsmediator Prostaglandin E<sub>2</sub> hinzugesetzt werden (Platzter et al. 1995). Diese Substanzen erhöhen die intrazelluläre Konzentration von cAMP (*cyclic Adenosine MonoPhosphate*), so dass eine cAMP-vermittelte Signaltransduktion bei der IL-10 Induktion vermutet wurde. Verschiedene Rezeptoren sind mit G-Proteinen, von denen einige bei Ligandenbindung die Adenylatzyklase aktivieren, gekoppelt. Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt die Dissoziation des tetrameren inaktiven PK(Protein-Kinase)A-Komplexes in seine aktiven katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. Es folgt die Translokation der katalytischen PKA-Untereinheiten in den Kern, wo Transkriptionsfaktoren einer Familie konstitutiv an CRE (*cAMP Responsive Element*) der

DNA assoziiert sind (Abb. 4). Zu dieser Transkriptionsfaktorfamilie gehören insgesamt 10 verschiedene Proteine, darunter CREB (*CRE Binding Protein*) und ATF (*Activating Transcription Factor*) (Habener 1990, Montminy 1997). Sie werden im Zellkern durch die PKA phosphoryliert und damit aktiviert.



**Abb. 4: cAMP-Stimulierbarkeit von IL-10 Promotor/Enhancer-Mutanten in THP-1 Zellen** (nach Platzer et al. 1999). **A:** IL-10 Promotor/Enhancer-Fragmente mit nativen und mutierten CRE-Motiven (Kreise) getesteter Reporterplasmide. In Klammern sind die Abstände der CRE-Motive zum Startpunkt der Translation (Position  $\pm 1$ ) in bp angegeben. **B:** cAMP-Aktivierung der Mutanten bezogen auf die des nativen Promotor/Enhancer-Fragmentes (100%).

Mittels Computeranalyse wurden vier Bereiche (CRE1-4) innerhalb des 1308 bp Fragmentes der IL-10 Promotor/Enhancer-Region gefunden, die eine Homologie zur CRE-Konsensus-Sequenz aufweisen (Platzer et al. 1999). Für die Motive CRE1, 3 und 4 konnte eine Bindung von Kernproteinen aus Monozyten nachgewiesen werden. Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass CRE4 zu 50% und CRE1 zu 20% für die cAMP-vermittelte IL-10 Expression in Monozyten verantwortlich sind. CRE3 scheint dagegen unbeteiligt zu sein (Platzer et al. 1999).

Bei simultaner Mutation von CRE1 und 4 verbleiben 50% der cAMP-induzierbaren Promotoraktivität, so dass erstens der Aktivitätsverlust nicht additiv ist und zweitens von einer Beteiligung weiterer Bereiche ausgegangen werden muss. Die 5'Deletion von 790 bp und damit die Deletion von CRE1 und 3 in pGL2-520 reduzierte die Aktivität auf 60%, wogegen die gleichzeitige Mutation dieser beiden Elemente nur 20% Aktivitätsverlust zur Folge hat (Abb. 4) (Platzer et al. 1999). In dem deletierten Fragment wurden deshalb

funktionelle AP-2-Elemente vermutet, was sich jedoch nicht bestätigte (C. Platzer, persönliche Mitteilung). Das um 932 bp 5'deletierte IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragment in pGL2-376 hatte noch eine 50%ige Aktivität, so dass auch hier noch funktionelle Elemente vermutet werden müssen.

Neben den CRE-Motiven sind auch andere regulatorische Sequenzen bekannt, die in die cAMP-abhängige Genregulation involviert werden können. Dazu gehören AP-1, AP-2, Sp1, Pit-1-Motive, Bindungsstellen für Östrogenrezeptoren sowie die Y-box, die einem invertierten CCAAT-Element entspricht (Zidek 1999). Von mehreren Autoren wird berichtet, dass CCAAT-Elemente an der cAMP-induzierten Genregulation der Zytokine IL-1 und IL-6 sowie einer Reihe kataboler Stoffwechselenzyme und den Akute-Phase-Proteinen der Leber beteiligt sind (Tsukada et al. 1994, Grassl et al. 1999, Wilson and Roesler 2002).

### **2. 3. Die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie**

An CCAAT-Elemente binden Transkriptionsfaktoren der C/EBP (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein*)-Familie, weshalb sie auch als C/EBP-Motive bezeichnet werden. Die Transkriptionsfaktorfamilie C/EBP wurde Mitte der 80er Jahre von Barbara Graves und Peter Johnson bei der Isolation von Transkriptionsfaktoren aus Rattenlebergewebe entdeckt (McKnight 2001). Zur C/EBP-Familie zählen über acht Isoformen, die von sechs Genen kodiert werden (Roesler 2001). Wie bei CREB handelt es sich bei C/EBP um sogenannte Leucizipper. Transkriptionsfaktoren dieser Familie verfügen über einen Bereich basischer Aminosäuren mit  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur, der die DNA-Bindungsdomäne darstellt sowie einer leucinreichen Aminosäuresequenz, die der Dimerisierung dient. CREB und C/EBP können Heterodimere bilden oder wechselseitig an ihre DNA-Motive binden (Akira and Kishimoto 1997, Guo et al. 2001). Das zytosolisch vorliegende C/EBP wird durch Phosphorylierung aktiviert und in den Kern transloziert. Die Phosphorylierung kann durch MAP oder Calcium-Calmodulin-abhängige Kinasen bzw. durch die PKC erfolgen (Mahoney et al. 1992, Guo et al. 2001).

#### **2.3.1. C/EBP in der cAMP/PKA-vermittelten Signaltransduktion**

Am Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Promotor wurde ein Synergismus der Transkriptionsfaktoren CREB und C/EBP bei der cAMP-abhängigen Aktivierung beschrieben (Roesler et al. 1995). Darüber hinaus ist hier eine cAMP-induzierte Promotoraktivität durch C/EBP ohne Beteiligung von CREB nachgewiesen. (Wilson and Roesler 2002). Da eine Phosphorylierung von C/EBP durch die PKA nicht beschrieben ist (Mahoney et al. 1992),

werden verschiedene andere Mechanismen in Betracht gezogen, um die Beteiligung von C/EBP an der cAMP-induzierten Genregulation zu erklären. Zu diesen alternativen Mechanismen zählt die verstärkte Expression von C/EBP über CRE-Motive im C/EBP Promotor/*Enhancer*-Bereich (Berrier et al. 1998, Pelletier et al. 1998). Darüber hinaus ist eine verstärkte C/EBP-Translokation in den Kern bei erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration bekannt (Metz and Ziff 1991). Struktur-Funktions-Analysen haben ergeben, dass C/EBP sowohl über konstitutiv, als auch über cAMP-abhängig transaktivierende Bereiche verfügt, die ineinander übergehen (Roesler et al. 1998, Wilson and Roesler 2002). Die konstitutive C/EBP-Transaktivierung wird dabei offenbar durch Protein-Protein-Interaktionen mit dem TBP (*TATA-Box Binding Protein*) und dem Kofaktor *TFIIB* des Initiationskomplexes vermittelt (Nerlov and Ziff 1994, 1995). Bezüglich der cAMP-abhängigen Transaktivierung durch C/EBP wird die Existenz eines Kofaktors vermutet, der seinerseits von der Phosphorylierung durch die PKA abhängig ist (Wilson and Roesler 2002).

### 2.3.2. C/EBP-Expression und Zelldifferenzierung

C/EBP ist ein gewebsspezifischer Transkriptionsfaktor, der vor allem an der Adipozyten- und Hepatozytenreifung sowie der Differenzierung von Zellen des hämatopoetischen Systems beteiligt ist. Im Speziellen ist die Hemmung der Proliferation und eine differenzierende Wirkung für C/EBP $\alpha$  beschrieben (Muller et al. 1999). Die Hemmung der Zellteilung beruht auf einer direkten Protein-Protein-Interaktion von C/EBP $\alpha$  mit den Regulatoren des Zellzyklus wie den zyklin-abhängigen Kinasen 2 und 4. Dadurch wird die Bindung dieser Regulatoren an Zyklin E bzw. D und im Folgenden die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der Zellteilung verhindert (Wang H. et al. 2001). Dieser Mechanismus ist also nicht auf die C/EBP $\alpha$ -Aktivität als Transkriptionsfaktor, der durch DNA-Bindung die Genexpression reguliert, sondern auf Protein-Protein-Interaktionen zurückzuführen (Umek et al. 1991). Darüber hinaus beruht die differenzierende Wirkung von C/EBP $\alpha$  auf der direkten Hemmung der E<sub>2</sub>F abhängigen Transkription von S-Phase Genen des Zellzyklus (Slomiany et al. 2000, Johansen et al. 2001). Während der Zellreifung variiert die Expression der verschiedenen C/EBP-Isoformen C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , und  $\zeta$  in Abhängigkeit von den Differenzierungsstadien (Scott et al. 1992, Tenen et al. 1997). In vielen Geweben, die C/EBP exprimieren, konnte die  $\alpha$ -Isoform nur in ausdifferenzierten Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden (McKnight 2001). Untersuchungen von Kernextrakten verschiedener Zelllinien der myelo-monozytären Reihe haben auch hier ein differenzierungsabhängiges Expressionsmuster der C/EBP-Isoformen gezeigt. Die myelo-monozytäre Vorläufer-Zelllinie

HL-60 enthält kaum nachweisbare Mengen C/EBP $\alpha$  bzw.  $\beta$ . Zellen der differenzierteren prä-monozytären Linie THP-1 exprimieren dagegen deutliche Mengen C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  (Prosch et al. 2001). Aus Reportergenstudien war bekannt, dass sich der IL-10 Promotor in THP-1 Zellen sehr gut und in HL-60 Zellen kaum durch cAMP stimulieren lässt. Vor diesem Hintergrund war es von Interesse zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der cAMP-Stimulierbarkeit des IL-10 Promotors und dem C/EBP-Gehalt in Monozyten, das heißt ihrem Reifegrad, besteht.

### **3. ZIELE DER ARBEIT**

Ziel meiner Arbeit war es zu untersuchen, ob die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie in die cAMP-vermittelte IL-10 Promotoraktivität von Monozyten involviert sind. Darüber hinaus sollten gegebenenfalls Art und Ausmaß einer Beteiligung von C/EBP an dieser Signaltransduktion charakterisiert werden. Diese Analysen sollten schließlich mit der beschriebenen Reststimulierbarkeit des IL-10 Promotors durch cAMP bei Mutation der CRE-Motive in Beziehung gesetzt werden.

Im Einzelnen galt es Antworten auf folgende Fragen zu finden:

1. Gibt es innerhalb der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region Motive, an die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie binden können?
2. Ist das endogene C/EBP in THP-1 Zellen an der cAMP-stimulierten Promotoraktivierung beteiligt?
3. Kann die Reststimulierbarkeit des Promotors durch cAMP bei Mutation der CRE-Motive durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie innerhalb der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region erklärt werden?
4. Haben Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie ein cAMP-unabhängiges, konstitutives Aktivierungspotential am IL-10 Promotor?
5. Können sowohl CREB- als auch C/EBP-Transkriptionsfaktoren unabhängig voneinander die IL-10 Transkription aktivieren?
6. Ist der niedrige C/EBP-Gehalt in HL-60 Zellen Ursache für die hier beobachtete Stimulationsresistenz des IL-10 Promotors gegenüber cAMP?
7. Hat die Lage von C/EBP-Motiven innerhalb der Promotor/*Enhancer*-Region eine Bedeutung für ihre Beteiligung an der IL-10 Transkription?

Die Ergebnisse sollten zum Verständnis der funktionellen Struktur der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region und der differenzierungsabhängigen Transkriptionsregulation von IL-10 und damit seiner biologischen Rolle beitragen.



## **4. MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1. Das MatInspector Professional Programm**

Das MatInspector Professional Programm bedient sich mehrerer Bibliotheken bereits bekannter TFBS (Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen), die durch Matrizenvergleiche als Schablone verwendet werden, um eine *in silico* Vorhersage möglicher TFBS innerhalb einer Sequenz zu treffen. Mit Hilfe dieses Programms ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) wurde die Sequenz der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region mit der GenBank<sup>™</sup> Accession Number Z301275 nach putativen TFBS untersucht. Für die variablen Parameter “*core similarity*” und “*matrix similarity*” wurde der Wert 0,7 bzw. die Einstellung “*calculated optimized*” gewählt.

### **4.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay**

Da die elektrophoretische Migration von proteingebundener gegenüber freier DNA verändert ist, können Protein-DNA Interaktionen in einem EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) nachgewiesen werden. Zur Visualisierung auf einem Röntgenfilm muss die DNA jedoch radioaktiv markiert werden. Da unser Labor nicht über die erforderliche Genehmigung verfügt, wurden diese Experimente zwar in Jena geplant, mussten jedoch beim Kooperationspartner am Institut für Virologie der Charité der Humboldt Universität Berlin von Frau PD Dr. Susanna Prösch durchgeführt werden. Die verwendeten Kernextrakte stammen aus cAMP-behandelten THP-1 Zellen und lagen zu Beginn meiner Arbeiten bereits vor. Als Target-DNA für diese Kernextrakte wurden doppelsträngige Oligonukleotide verwendet. Ihre Sequenzen entsprechen einzelnen Abschnitten der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region, die ein CRE- bzw. ein putatives C/EBP-Motiv enthalten (Tab. 1) und wurden von der Firma MWG (Ebersbach) synthetisiert. Die Konsensusoligonukleotide wurden von Santa Cruz Biotechnologie (Heidelberg) bezogen. Die Oligonukleotide wurden hybridisiert und nach Bedarf mit <sup>32</sup>Phosphat radioaktiv markiert. Für die Protein-DNA-Interaktion *in vitro* wurden jeweils 1 ng eines radioaktiv markierten, doppelsträngigen Oligonukleotids mit 10 µg Protein aus Kernextrakt in einem Volumen von 20 µl für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

## Die verwendeten Oligonukleotide für EMSA und Mutagenese

Name	Sequenz
<b>C/EBP1/CRE3</b>	tgtacag <b>gtgatttaac</b> tctcg
<b>mutCRE3</b>	..... <b>tg</b> .....
<b>mutC/EBP1</b>	..... <b>gac.agtc</b> .....
<b>C/EBP2</b>	gggctg <b>cttgggaact</b> ttgagg
<b>C/EBP3</b>	caatt <b>atttctcaat</b> cccatt
<b>mutC/EBP3</b>	..... <b>gactagtc</b> .....
<b>C/EBP4</b>	ttgtattctgg <b>aatgggcaat</b> ttgtc
<b>C/EBP5</b>	cttgct <b>cttgcaaaac</b> caaacc
<b>mutC/EBP5</b>	..... <b>gact.gtc</b> .....
<b>C/EBP-Konsensus</b>	tgcag <b>attgcgcaat</b> tctgca
<hr/>	
<b>CRE1</b>	gaagaagtcc <b>tgatgtca</b> ctgccccgg
<b>CRE4</b>	aatttgt <b>ccacgtca</b> ctgtgacct
<b>CRE-Konsensus</b>	agagattgccc <b>tgacgtca</b> gagagctga

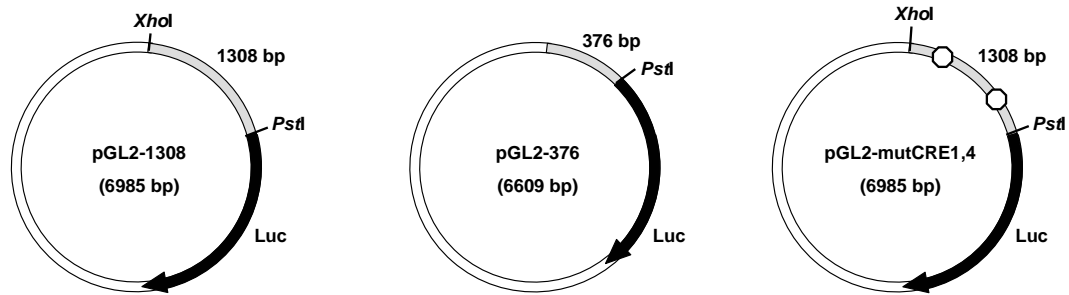
**Tab. 1:** TFBS sind grau unterlegt. Bei Oligonukleotiden, die Mutationen (mut) der Motive enthalten, sind nur die von der nativen Sequenz differierenden Basen angegeben, die verbleibenden sind durch Punkte ersetzt.

Das Reaktionsgemisch enthielt zusätzlich 10mM Hepes (pH 7,9), 50mM NaCl bzw. KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 1mM Spermidin, 15mM EDTA, 1,5 µg Poly(dI-dC) und 10% Glycin. Im Falle einer Kompetitionsreaktion oder bei *Supershift*-Analyse wurden 100 ng des unmarkierten Kompetitionsoligonukleotides bzw. 3 µg des spezifischen Antiserums hinzugegeben. Die Antiseren gegen C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  sowie gegen ATF-1 wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnologie bezogen. Die DNA-Protein-Komplexe wurden in einem 5%igen nativen Polyacrylamid-Gel in Tris-Glycin Puffer getrennt. Zur Visualisierung wurden die Gele anschließend auf BioMax-Filme (Kodak, Stuttgart) exponiert.

### 4. 3. Plasmide

#### 4.3.1. Reportergenplasmide

Um die IL-10 Transkription quantifizieren zu können, wurden Reportergenplasmide der pGL2-Reihe von Promega (Mannheim) verwendet, die das Luciferasegen der nordamerikanischen Leuchtkäferart *Photinus pyralis* enthalten. Die Plasmide pGL2-1308, pGL2-376 und pGL2-mutCRE1,4 lagen zu Beginn meiner Arbeiten bereits vor (Abb. 5).



**Abb. 5: Karten der Reportergenplasmide pGL2-1308, -376 und -mutCRE1,4.** Das IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragment ist grau unterlegt und das Luciferasegen (Luc) durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Mutierte CRE-Motive sind durch weiße Kreise hervorgehoben.

Bei den Plasmiden pGL2-1308 und pGL2-376 sind 1308 bp bzw. 376 bp der Region stromaufwärts des humanen IL-10 Startcodons der Translation vor das Luciferasegen kloniert. Bei der Doppelmutante pGL2-mutCRE1,4 sind innerhalb des 1308 bp IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragmentes die Motive CRE1 und 4, wie in Tab. 1 angegeben, mutiert (Platzer et al. 1999).

#### 4.3.2. Expressionsplasmide

In Kotransfektionsversuchen wurden neben den Reportergenplasmiden auch Expressionsplasmide für die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$ , p30 und CREB133 verwendet. Das Expressionsplasmid pMSV/EBP $\alpha$  enthält die cDNA für das C/EBP $\alpha$  der Ratte unter Kontrolle des MSV(*Mouse Sarcoma Virus*)-Promotors und wurde von Professor Steven L. McKnight (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) zur Verfügung gestellt. Der korrespondierende Kontroll- bzw. Leervektor pMSV wurde von Frau PD Dr. Susanna Prösch (Institut für Virologie der Charité der Humboldt Universität Berlin) hergestellt und mir für meine Versuche überlassen. Das Expressionsplasmid pcDNA3/p30 stammt von Achim Leutz (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) und enthält die cDNA für die 30kDa Isoform des Ratten-C/EBP $\alpha$ . Der korrespondierende Leervektor wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Das Expressionsplasmid pCMV/CREB133 für eine Mutante des Transkriptionsfaktors CREB unter Kontrolle des CMV(*CytoMegalovirus*)-Promotors wurde von der Firma Clontech (BD Biosciences, Heidelberg) erworben. Der dazugehörige Kontrollvektor pCMV wurde durch eine *Xho*I-Restriktionsspaltung und anschließender Religation des Plasmidfragmentes hergestellt. Zur Optimierung der Elektroporationsbedingungen kam zusätzlich noch das Expressionsplasmid pEGFP-C1 zur Anwendung. Es kodiert für das GFP (*Green Fluorescent Protein*) der Tiefseequalle *Aequorea victoria* und wurde von der Firma Clontech bezogen.

#### 4.4. Arbeiten mit *E.coli*

##### 4.4.1. Herstellung kompetenter *E.coli*

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden *E.coli* DH5 $\alpha$ -Bakterien verwendet. Um kompetente Bakterien zur Elektroporation zu erhalten, wurde 1 l LB(Luria Bertani)-Medium (10 g/l Bacto-Tryptone (DIFCO, Augsburg), 5 g/l Bacto-Yeast (DIFCO) und 5 g/l NaCl) mit einer Einzelkolonie DH5 $\alpha$  beimpft. Diese Kultur wurde bei 37°C mit 200 rpm (*rounds per minute*) bis zur Bakteriendichte der OD<sub>600</sub> 0,5-1,0 geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien in eisgekühlten, sterilen 200 ml Röhrchen bei 4000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden in insgesamt 1 l kaltem *Aqua dest.* resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets zunächst in 0,5 l kaltem *Aqua dest.*, dann in 20 ml und schließlich in 3 ml kaltem 10%igem Glycerol aufgenommen und zu 50  $\mu$ l portioniert. Die im Stickstoff schockgefrorenen Aliquots wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

##### 4.4.2. Transformation und Kultur

Zur Transformation wurden jeweils 50  $\mu$ l kompetenter DH5 $\alpha$  und 200 ng Plasmid bzw. 5  $\mu$ l Dialysat aus einem Ligationsansatz eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte in vorgekühlten 2 mm Elektroporationsküvetten (Invitrogen) bei 200  $\Omega$ , 21  $\mu$ F und 2,5 kV mit dem *Gene zapper* 450/2500 von IBI (Cambridge, Großbritannien). Anschliessend wurden die Bakterien in 1 ml SOC Medium (0,5% Bacto-Yeast (DIFCO), 2% Bacto-Tryptone (DIFCO), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) aufgenommen und für 15 Minuten bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Kultur wurden 10 und 50  $\mu$ l auf LB- Agarplatten (15g/l Bacto-Agar (DIFCO) in LB-Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je nach Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids wurden den LB-Agarplatten 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Sigma, Braunschweig) bzw. 30  $\mu$ g/ml Kanamycin (Sigma) zugesetzt. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse in 2 ml LB-Medium mit demselben Antibiotikum überführt. Nach mindestens 8 Stunden wurden aus diesen Kulturen entweder direkt die Plasmid-DNA präpariert oder Kulturen von 200 ml zur weiteren Amplifikation beimpft.

## 4. 5. DNA-Manipulationen und Analyse

### 4.5.1. Mutagenese

Bei der Einführung einer Mutation kam das *GeneEditor<sup>TM</sup> in vitro Site-Directed Mutagenesis System* von Promega zur Anwendung. Alle speziellen Reagenzien waren, sofern nicht anders angegeben, in dem Systemprodukt von Promega enthalten. Da die Vorgehensweise im Einzelnen den Anweisungen des Herstellers entsprach, soll hier zum Zwecke des Verständnisses lediglich der Algorithmus erläutert werden. Das Prinzip dieses Mutagenese-Systems beruht auf der simultanen Einführung der gewünschten Mutation mit einer Mutation des  $\beta$ -Lactamasegens im Plasmid. Letzteres verändert die  $\beta$ -Lactamase-Substratspezifität und somit das Spektrum der Antibiotika-Resistenz. Die Mutanten lassen sich auf diese Weise mit einem speziellen Selektionsmedium schnell identifizieren. Das 5'-phosphorylierte Selektionsoligonukleotid zur Einführung der  $\beta$ -Lactamase-Mutation wurde von Promega gestellt. Für die Einführung der C/EBP-Mutation wurden kommerziell synthetisierte Oligonukleotide (MWG) verwendet, die im EMSA keine Proteinbindungsaktivität zeigten. Ihre Sequenzen (mutC/EBP1, mutC/EBP3, mutC/EBP5) sind in der Tab. 1 aufgeführt. Alle drei Mutationsoligonukleotide enthalten die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SpeI*. Sie wurden mit T4-Polynukleotidkinase, Kinase 5x Forward Puffer und ATP (Gibco, Karlsruhe) an ihrem 5'-Ende phosphoryliert. Das Ausgangsplasmid pGL2-1308 wurde physikalisch-chemisch denaturiert, so dass sich die DNA-Doppelstränge voneinander lösten. Sowohl das Selektions- als auch ein Mutationsoligonukleotid wurden zur Hybridisierung mit einem Strang des denaturierten Plasmides gebracht. Ausgehend von den Oligonukleotiden wurde der zweite Plasmidstrang anschließend enzymatisch synthetisiert und ligiert. Das entstandene Heteroduplex Plasmid wurde in *E.coli* BHM 71-18 *mutS*-Bakterien transformiert und die Bakterien im Selektionsmedium kultiviert. Da dieser Bakterienstamm keinen *in vivo mismatch repair* durchführen kann, entstehen durch semi-konservative Replikation aus den Heteroduplexplasmiden mit einem mutierten und einem nativen Strang mutierte und native Homoduplexplasmide. Durch das Selektionsmedium haben Bakterien mit mutierten Plasmiden einen Wachstumsvorteil. Für die Gewinnung von Einzelkolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und in kompetente *E.coli* JM109-Bakterien transformiert. Nach Kultivierung im Selektionsmedium wurde die Plasmid-DNA aus Einzelkolonien erneut isoliert.

#### 4.5.2. Restriktionsspaltung

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden sowie zur analytischen Identifizierung wurden Plasmide mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die verwendeten Enzyme sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen

Name	Sequenz	Hersteller
<i>AvrII</i>	CCTAGG	Gibco
<i>Bsu36I</i>	CCTNAGG	NEB
<i>SacI</i>	CACGTG	Promega
<i>SmaI</i>	CCCGGG	Promega
<i>SpeI</i>	ACTAGT	Gibco
<i>XhoI</i>	CTCGAG	NEB

**Tab. 2:** Verwendete Restriktionsendonukleasen mit ihrer Erkennungssequenz und kommerzieller Herkunft. N=A,C,G oder T

Die Reaktionen erfolgten unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzymes empfohlenen Pufferbedingungen in einem Volumen von 50 µl bei 37°C für 60-90 Minuten. Im Falle einer Doppelspaltung wurde zum evtl. erforderlichen Pufferwechsel eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender DNA-Fällung durch Ethanol eingefügt. In der Regel wurden pro Spaltung 0,5 *units* Enzym für 0,5 µg DNA eingesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch direkt der Gelelektrophorese zugeführt.

#### 4.5.3. Dephosphorylierung

Zur Vermeidung der Religation eines Fragmentes mit kompatiblen Enden wurden die Enden dephosphoryliert. Dazu wurden 42 µl des DNA-Eluates aus der Gelextraktion mit 3 µl intestinaler alkalischer Phosphatase (Gibco), 5 µl entsprechenden 10x Puffer (Gibco) und 0,5 µl *Aqua dest.* für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um das Enzym zu deaktivieren wurde das Gemisch anschließend für 10 Minuten auf 70°C erhitzt und mit 50 µl Phenol/Chloroform versetzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo die DNA mit 150 µl Ethanol gefällt und in 20 µl *Aqua dest.* gelöst wurde.

#### 4.5.4. DNA-Ligation

Ca. 100 ng *Aqua dest.*-gelöster DNA wurden mit 5-10 *units* T4-Ligase (Promega) und 4 µl 5x Ligase Puffer (Promega) in einem Volumen von 20 µl ligiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 16°C belassen.

Vor der Transformation in kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  wurden 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes über eine Nitrozellulosefiltermembran mit einer Porengröße von 0,025  $\mu$ m (Millipore, Eschborn) dialysiert.

#### 4.5.5. Auffüllen eines 3'Überhangs und blunt-end-Ligation

Zum Auffüllen des 3'Überhangs an einem Restriktionsende zur anschließenden *blunt-end*-Ligation wurden 27  $\mu$ l Eluat aus der Gelextraktion mit 1  $\mu$ l *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase (Gibco), 1  $\mu$ l T4 Ligase (Gibco) sowie 3  $\mu$ l Synthesepuffer (Gibco) versetzt. Die Reaktion wurde für 2 Stunden bei 37°C belassen, bevor sie über Nacht bei 16°C inkubiert wurde.

#### 4.5.6. Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Isolation wurden Plasmidfragmente in 1%igen Agarose-Gelen mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt und im UV-Durchlicht (302nm) visualisiert. Die Proben wurden dazu mit *Loading Buffer* (20% Ficoll 400, 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0), 1% SDS, 0,25% Bromphenolblau) im Volumenverhältnis 1:10 beschwert. Als DNA-Größenstandard wurde 1  $\mu$ g einer 1 kb Leiter (Invitrogen) verwendet.

#### 4.5.7. Sequenzierung

Im Falle der Dreifachmutante pGL2-mutC/EB1,3,5 wurde eine erfolgreiche Mutagenese durch Sequenzierung mit dem *BigDye Terminator cycle sequencing Kit* (Version 2,0, Applied Biosystems) am Institut für Molekulare Biotechnologie (Jena) überprüft. Die dabei verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 3 aufgeführt.

Oligonukleotide für Sequenzierung

Name	Sequenz	Position
B3-int1	TTT CAT TCT ATG TGC TG	-927 /-944
B3-int4	GCA AAG AGA AGT CTT GGG	-480 /-497

**Tab. 3:** Die Position bezieht sich auf den Abstand der ersten und letzten Base des Oligonukleotids vom Startpunkt der Translation (Position  $\pm 1$ ) in bp.

## **4. 6. DNA-Präparation**

### **4.6.1. DNA-Isolation aus Agarose-Gelen**

Zur weiteren Verarbeitung wurden Plasmidfragmente nach elektrophoretischer Auftrennung aus Agarose-Gelen isoliert. Im UV-Licht wurden die Fragmente in Gelblöckchen mit dem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Aus den Gelblöckchen wurde die DNA mit Hilfe des *GelExtraction Kits* (Qiagen, Hilden) isoliert. Den Anweisungen des Herstellers folgend wurde die DNA schließlich in 50 µl *Aqua dest.* eluiert.

### **4.6.2. Phenol/Chloroform-Präparation von Plasmiden**

Zur Analyse bzw. weiteren Manipulation wurde Plasmid-DNA aus 1-3 ml *E.coli*-Kulturen isoliert und mit Phenol/Chloroform gereinigt. Das Bakterienpellet wurde dazu in 100 µl *Aqua dest.* resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 (0,2M NaOH, 1% SDS) zugegeben, vorsichtig vermischt und die Reaktion wieder für 5 Minuten auf Eis belassen, ebenso nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (3M Kaliumacetat, pH 4,8) und kräftigem Schütteln. Das Gemisch wurde anschließend für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die obere Phase in 300 µl Isopropanol überführt, kurz inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 70%igem kalten Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl *Aqua dest.* gelöst. Zur Kontrolle und Quantifizierung der Präparationen wurden ggf. 5 µl auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen.

### **4.6.3. CsCl-Präparation von Plasmiden**

Für eine Transfektion in eukaryontische Zellen wurden die Plasmide in 200 ml *E.coli*-Kulturen amplifiziert, anschließend isoliert und über einen CsCl-Gradienten gereinigt. Zur Isolation des Plasmids aus einer 200 ml Übernachtskultur wurden die Bakterien 30 Minuten bei 5000 rpm und 4°C präzipitiert, das Bakterienpellet in 8 ml *Aqua dest.* gründlich resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis belassen. Jeweils nach Zugabe von 16 ml Lösung 2 (0,2M NaOH, 1% SDS), wiederholtem Schwenken der Mischung und anschließender Zugabe von 12 ml Lösung 3 (3M Kaliumacetat, pH 4,8) bei kräftigem Schütteln wurde die Probe für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C wurde der klare Überstand in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und mit 22 ml Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die



Probe erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml TE-Puffer (10 mM TrisHCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) gelöst, mit 0,95 g Ammoniumacetat versetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C. Danach wurde der Überstand in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und die DNA mit 12,5 ml Ethanol gefällt.

Zur Reinigung wurde das Pellet zusammen mit 4,4 g CsCl in 3,3 ml TE-Puffer und 0,4 ml Ethidiumbromid (10mg/ml) gelöst. Das Gemisch wurde in ein OptiSeal-Tube (13x48mm, Vol 4,9 ml, Beckmann, Unterschleissheim-Lohhof) luftblasenfrei überführt und im Vertikalrotor VTi65.2 (Ultrazentrifuge, Beckmann) bei 65000 rpm und 17°C für mindestens 6 Stunden zentrifugiert. Im dabei entstandenen CsCl-Gradienten reicherte sich die Plasmid-DNA in dem kleinen Volumen eines Ringes mit der Dichte von 1,391-1,393 g/ml an. Nach ungebremsster Beendigung des Rotorlaufes wurde der Plasmidring mit einer Kanüle unter der UV-Lampe abgesaugt und in TE-Puffer aufgenommen. Durch wiederholte Zugabe von TE-gesättigtem n-Butanol und Ausschütteln wurde der Großteil des Ethidiumbromides aus der Probe extrahiert und mit der oberen Phase abgenommen. Der in TE-Puffer gelösten Plasmid-DNA wurde das 0,6-fache Volumen Isopropanol zur Fällung hinzugegeben. Nach Inkubation auf Eis und anschließender 20-minütiger Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 300 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe des 2,5-fachen Ethanolvolumens, wiederholter 10-minütiger Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation bei 18000 rpm und 4°C enthielt das Pellet sterile Plasmid-DNA, die nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol in 300 µl sterilem TE-Puffer gelöst wurde.

#### ***4.6.4. Bestimmung und Einstellung von DNA-Konzentrationen***

Zur Quantifizierung der CsCl-gereinigten Plasmid-DNA wurde die Konzentration in einer 1:100 Verdünnung durch die Absorption bei 260 nm im Spektrophotometer UV-1601 (Shimadzu, Duisburg) bestimmt. Anschließend wurde die Plasmidkonzentration durch entsprechende TE-Pufferzugabe auf 1 mg/ml eingestellt.

### ***4. 7. Arbeiten mit Zelllinien***

#### ***4.7.1. Zellkulturen***

Es wurden die Zelllinien HL-60 und THP-1 von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen verwendet. THP-1 Zellen sind Vertreter der prä-monozytären und HL-60 Zellen Vertreter der myelo-monozytären Reihe. Beide Zelllinien wurden im Zellkulturmedium RPMI der Firma Biochrom (Berlin) mit 10% fetalem

Kälberserum der Charge 428X (Biochrom), 100 units bzw.  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin/Streptomycin (Sigma) kultiviert. Das verwendete Serum ist als mykoplasmenfrei ausgewiesen und die Charge 428X wurde auf niedrigen Endotoxin-Gehalt getestet. Die HL-60 und THP-1 Zellen wurden in 25 bzw. 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Forma SteriCult Inkubator 3862 (Forma scientific Inc., Life Science international GmbH, Frankfurt a.M.) bis zu einer Dichte von 1,2 bzw.  $0,7 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

#### **4.7.2. Transfektion von HL-60 und THP-1 Zellen**

Von der jeweiligen Zelllinie wurden  $5 \times 10^6$  Zellen/0,25 ml Medium in 0,4 cm Elektroporationsküvetten (Invitrogen) mit dem Gene zapper 450/2500 von IBI (Cambridge, Großbritannien) elektroporiert.

Zur Ermittlung der optimalen Elektroporationsbedingungen wurden 5  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1 zugegeben. Nach Elektroporation wurden die Zellen zu  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Multiwellplatten (Greiner) ausplattiert und für mindestens 8 Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Axiovert 25 Fluoreszenzmikroskops der Firma Zeiss (Jena) das optimale Verhältnis überlebender und transfizierter, GFP exprimierender Zellen ermittelt. Als optimale Elektroporationsbedingungen für beide Zelllinien erwiesen sich 100  $\Omega$ , 1200  $\mu\text{F}$  und 300 V. Die Transfektionseffizienzen in beide Zelllinien waren vergleichbar und erreichten 15-30%, so dass diese Parameter als Standardbedingung für die Elektroporation festgelegt wurden.

Für die Reporter-genversuche wurden jeweils 10  $\mu\text{g}$  des Reporter-genplasmids transfiziert. Gegebenenfalls wurden zusätzlich, sofern nicht anders angegeben, 5  $\mu\text{g}$  eines Expressionsplasmids kotransfiziert. Beim Einsatz unterschiedlicher Mengen Expressionsplasmid innerhalb einer Versuchsreihe, wurde die Gesamtplasmidmenge mit den entsprechenden Leervektoren (pMSV, pcDNA3, pCMV) auf einheitliche Mengen innerhalb der Versuchsreihe aufgefüllt.

### **4. 8. Luciferase-Reporter-gen-Assay**

Nach Elektroporation wurden die Zellen zu  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Multiwellplatten (Greiner) ausplattiert und bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Zur Stimulation wurden verschiedene Konzentrationen, falls nicht anders angegeben, 500  $\mu\text{M}$  des membrangängigen dibutyryl-cAMP (Sigma) hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt, bei 4000 rpm für 5 Minuten

abzentrifugiert und das Medium verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 µl Lysispuffer (Promega) resuspendiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Zellmembranen zerstört wurden. Die Zelltrümmer wurden anschließend 2 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert und jeweils 10 µl aus dem Überstand des Lysates wurden für die Quantifizierung der Luciferaseenzym-Aktivität sowie für die Bestimmung des Proteingehaltes verwendet.

Für die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität wurden die Empfehlungen der Anleitung zum *Luciferase Assay Kit* von Promega zugrunde gelegt. Die Messung erfolgte im LB 953 Luminometer (Berthold, Bad Wildbad), der automatisiert jeder Probe 50 µl des Enzymsubstrates Luciferin (Promega) zusetzt und im Anschluss die Lichtemission nach 2 und 10 Sekunden in *relative light units* bestimmt.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in Halbmikroküvetten (Greiner) in 1 ml *Aqua dest.* Nach Zugabe von 1 ml *Bradford Reagent* (Sigma) wurde die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer UV-1601 (Shimadzu) und damit die Proteinkonzentration bestimmt. Aus dem Verhältnis der Luciferase-Aktivität und dem Gesamtproteingehalt einer Probe wurde die relative Luciferase-Expression in bE (beliebige Einheiten) errechnet. Die relative Luciferase-Expression entspricht dabei der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Aktivität. Die Stimulationsfaktoren ergaben sich jeweils aus dem Verhältnis der stimulierten und der unstimulierten IL-10 Promotor/*Enhancer*-Aktivität.

#### **4. 9. Statistische Berechnung**

Um den Unterschied zweier Wertepopulationen auf Signifikanz zu untersuchen, wurde das Programm SPSS (Version 11.5 für Windows) verwendet. Die Werte wurden dabei im *Mann-Whitney-U Test* als ein nicht-parametrischer Test bei zwei unabhängigen Stichproben analysiert. Das Programm errechnete dabei die asymptotische Signifikanz, für die bei einem Wert unter 0,05 der Unterschied zwischen zwei Wertepopulationen als signifikant anzusehen ist.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie binden an drei Motive der IL-10 Promotor/Enhancer-Region.

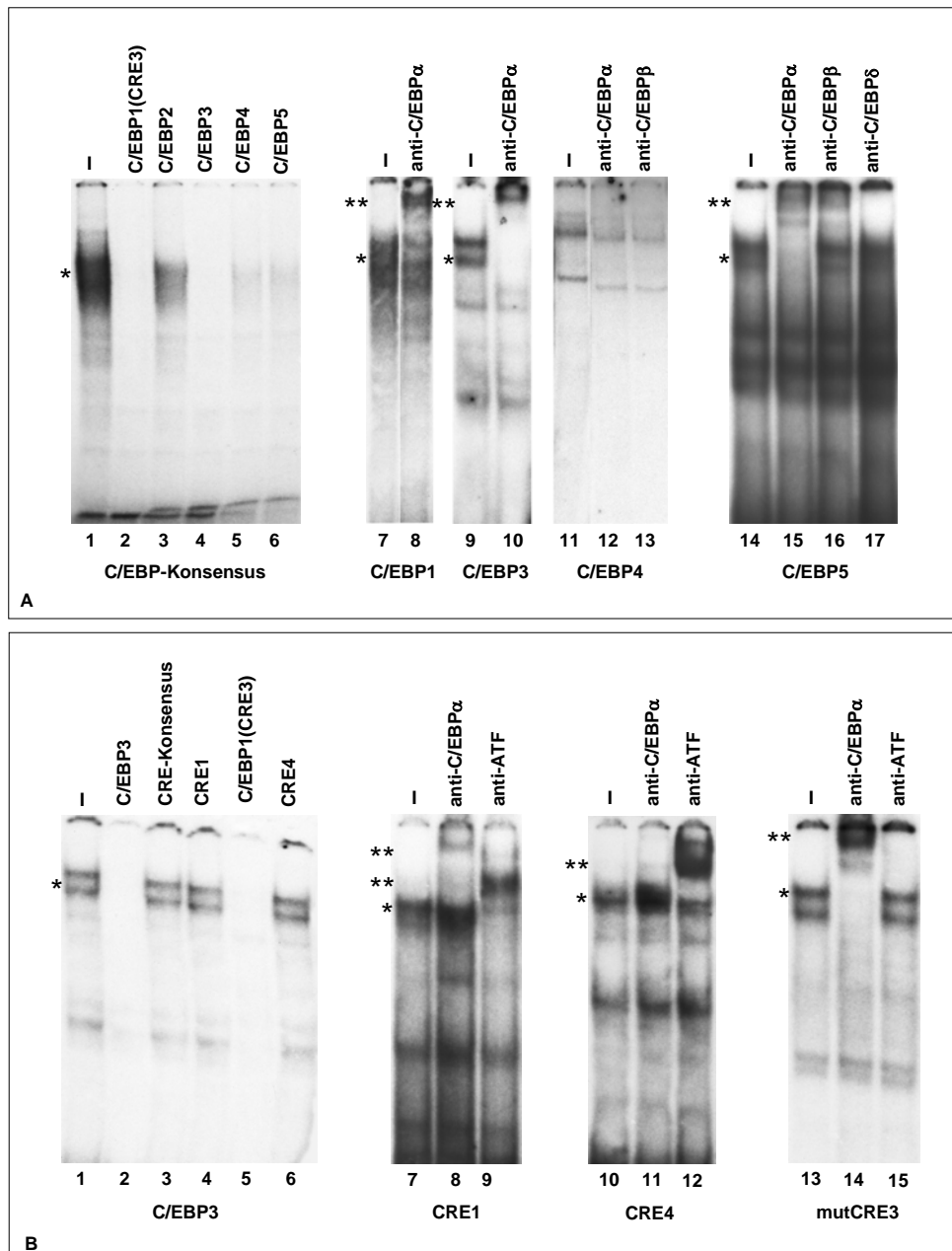
Um Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor C/EBP innerhalb der IL-10 Promotor/Enhancer-Region ausfindig zu machen, wurde ein Matrizenvergleich mit verschiedenen Bibliotheken bereits bekannter TFBS mit Hilfe des *MatInspector Professional* Programms durchgeführt. Das Programm ermittelte 184 relative Übereinstimmungen zu bekannten TFBS seiner Bibliotheken. Darunter fanden sich fünf C/EBP-Motive, die von 5' nach 3' fortlaufend nummeriert wurden. Ihre Sequenzen und Positionen in der IL-10 Promotor/Enhancer-Region sind in Tab. 4 zusammengestellt. Eines der C/EBP-Motive, bezeichnet als C/EBP1, entspricht dem bereits bekannten CRE3-Motiv.

Position und Sequenz der putativen C/EBP-Motive in der IL-10 Promotor/Enhancer-Region		
Motiv	Position	Sequenz
C/EBP1 (CRE3)	-866/-852	gTgatGtAAc
C/EBP2	-585/-574	cTTGgGaAcT
C/EBP3	-453/-439	ATTtCtCAAT
C/EBP4	-436/-418	AaTGgGCAAT
C/EBP5	-44/-30	cTTGCaaAAc
-----		
C/EBP-Konsensus		ATTGCGCAAT

**Tab. 4:** Die Position bezieht sich auf den Abstand zum Startpunkt der Translation (Position  $\pm 1$ ) in bp. Basen, die mit der C/EBP-Konsensus-Sequenz übereinstimmen, sind in Großbuchstaben angegeben.

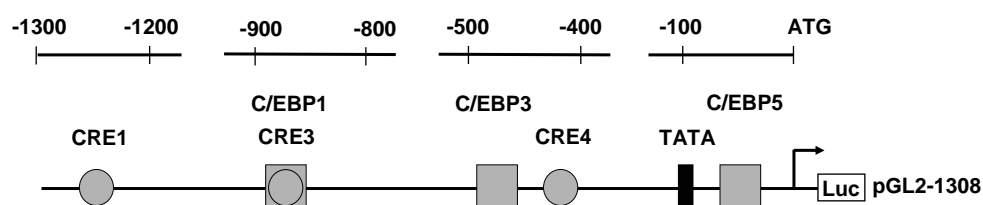
Um Proteinbindungen an die fraglichen C/EBP-Motive (Tab. 4) nachzuweisen, wurden entsprechende Oligonukleotide (Tab. 1) im EMSA untersucht. Dazu wurden Kernextrakte aus THP-1 Zellen verwendet, für die ein hoher C/EBP-Gehalt bekannt ist (Prosch et al. 2001). Die Oligonukleotide C/EBP1, 3, 4 und 5, jedoch nicht C/EBP2, kompetierten die

Kernproteinbindung an das radioaktiv markierte C/EBP-Konsensus-Oligonukleotid (Abb. 6A, Spuren 2-5 und 6).



**Abb. 6: EMSA zum Nachweis von Interaktionen zwischen Motiven der IL-10 Promoter/Enhancer-Region und THP-1 Zellkernproteinen *in vitro*** (durchgeführt beim Kooperationspartner, nach Brenner et al. 2003). **A:** C/EBP-Motive. **B:** CRE-Motive. 10  $\mu$ g Zellkernprotein wurden mit 1 ng radioaktiv markiertem, doppelsträngigen Oligonukleotid inkubiert. Teilweise wurden die Reaktionen mit 100 ng unmarkierten Oligonukleotid kompetiert bzw. 3  $\mu$ g Antiserum hinzugefügt. Das Gemisch wurde in 5%igem Polyacrylamid-Gel getrennt und auf den dargestellten BioMax-Filmen exponiert. Radioaktiv markierte Oligonukleotide sind unterhalb, und unmarkierte Kompetitionsoligonukleotide bzw. Antiseren sind oberhalb des Radiogramms näher bezeichnet. Protein-DNA-Komplexe sind durch (\*) und Protein-DNA-Antikörperkomplexe durch (\*\*) jeweils linksseitig gekennzeichnet.

*Supershift*-Analysen mit den markierten C/EBP1, 3, 5-Oligonukleotiden ergaben, dass die gebundenen Protein-Komplexe die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  jedoch nicht die  $\delta$ -Isoform enthalten (Abb. 6A, Spuren 8, 10, 15-17). Exemplarisch sind die Ergebnisse für C/EBP5 mit allen drei Antiseren dargestellt (Abb. 6A, Spuren 15-17). Der an C/EBP4 gebundene Protein-Komplex reagierte mit keinem Antiserum und scheint deshalb kein C/EBP zu enthalten (Abb. 6A, Spuren 12 und 13). Um die Spezifität der Proteinbindung an die Oligonukleotide zu bestätigen, wurden die Motive C/EBP1, 3 und 5, wie in Tab. 1 aufgeführt, durch einen Austausch von 7 bzw. 8 Basenpaaren mutiert und erneut im EMSA getestet. Keines der mutierten C/EBP-Motive zeigte verbleibende Bindungsaktivität (nicht dargestellt). An dem bereits bekannten CRE3-Motiv, welches nun als C/EBP1 neu bezeichnet wird, konnte die Bindung von C/EBP-Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 6A, Spuren 2 und 8). Deshalb wurden auch CRE1 und CRE4 dahingehend erneut untersucht. Im Kompetitionsversuch konnten die an C/EBP3 gebundenen Proteine weder von CRE1 und 4 noch von der CRE-Konsensus-Sequenz verdrängt werden (Abb. 6B, Spuren 4 und 6). Der *Supershift* mit Antiseren gegen C/EBP $\alpha$  bzw. ATF belegt, dass zumindest der an CRE1 bindende Protein-Komplex neben ATF (Abb. 6B, Spur 9) und CREB (hier nicht dargestellt, Platzer et al. 1999) geringe Mengen C/EBP $\alpha$  (Abb. 6B, Spur 8) enthält. Im Protein-Komplex an CRE4 wurde dagegen kein C/EBP nachgewiesen (Abb. 6B, Spuren 11 und 12). Um die Bindung von Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie an CRE-Motive zu verhindern, genügt üblicherweise der Austausch von zwei Basenpaaren. Diese Mutation verhinderte jedoch nicht die Bindung von C/EBP an mutCRE3. Der *Supershift* mit entsprechenden Antiseren zeigt, dass das mutCRE3-Oligonukleotid C/EBP $\alpha$ , jedoch nicht ATF aus THP-1 Kernextrakten binden kann (Abb. 6B, Spuren 14 und 15).

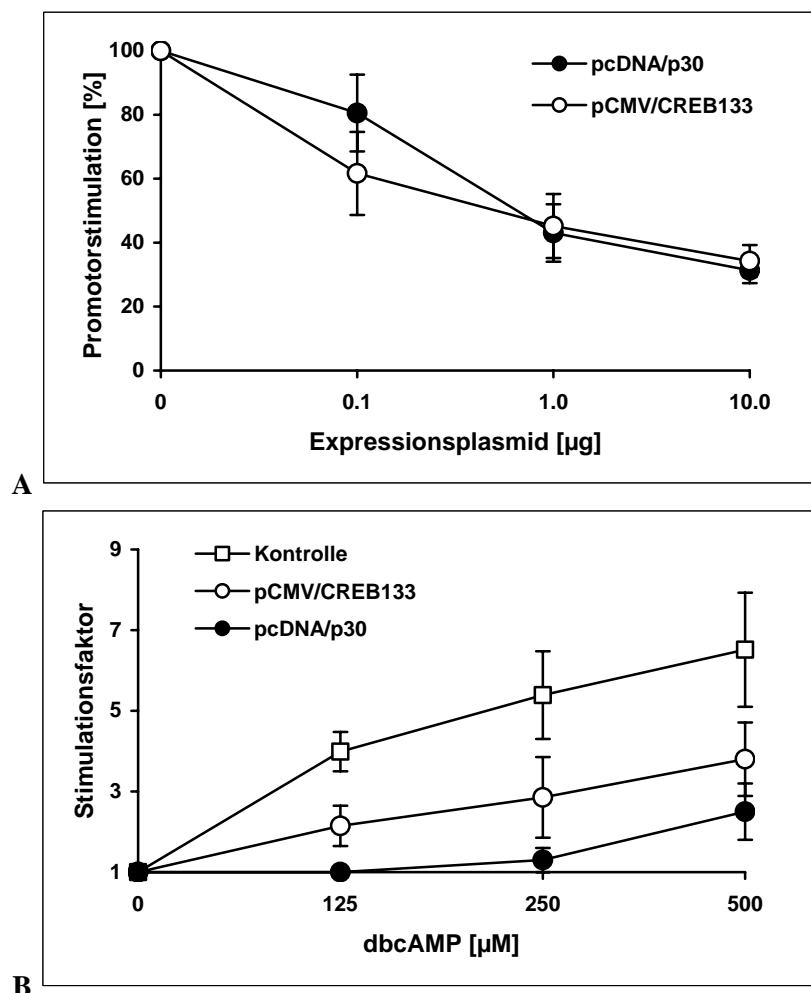


**Abb. 7: CRE und C/EBP-Motive des IL-10 Promotor/Enhancer-Fragmentes in pGL2-1308.** CRE- und C/EBP-Motive sind durch Kreise bzw. Quadrate symbolisiert. Dem Translationsstart ist die Position  $\pm 1$  zugeordnet.

Basierend auf den Ergebnissen des EMSAs kann von drei C/EBP- und zwei CRE-Motiven in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region ausgegangen werden. In Abb. 7 ist deren Anordnung schematisch dargestellt.

## 5.2. Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$ ist an der cAMP-induzierten IL-10 Promotoraktivierung in THP-1 Zellen beteiligt.

Zunächst sollte festgestellt werden, welchen Einfluss der Transkriptionsfaktor C/EBP bei der cAMP-induzierten IL-10 Promotoraktivierung in Monozyten hat. Dazu wurde ein Expressionsplasmid für die 30 kDa *splice*-Variante von C/EBP $\alpha$  (pcDNA3/p30) mit dem Reporterogenplasmid pGL2-1308 in THP-1 Zellen kotransfiziert (Abb. 8).



**Abb. 8:** Einfluss von p30 und CREB133 auf die cAMP-stimulierte IL-10 Promoteraktivierung in THP-1 Zellen (nach Brenner et al. 2003).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 10 µg Reporterogenplasmid pGL2-1308 sowie mit einem Expressionsplasmid transfiziert und im Anschluss mit und ohne dbcAMP inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zelllysat bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 unabhängigen Versuchen.

**A:** Konzentrationsabhängige Hemmung der cAMP-stimulierten IL-10 Promotoraktivität durch p30 und CREB133. Unterschiedliche Plasmidmengen im Transfektionsansatz wurden mit pCMV bzw. pcDNA3 ausgeglichen. Die mittlere cAMP-Stimulation bei Kotransfektion von 10 µg CMV bzw. pcDNA3 entspricht 100%. **B:** Die cAMP-Stimulierbarkeit des IL-10 Promotors bei Kotransfektion von 5 µg pcDNA/p30 bzw. pCMV/CREB133. Die Kontrollkurve entspricht den Mittelwerten aus Stimulationsfaktoren bei 5 µg pCMV bzw. pcDNA3 Kotransfektion.

Diese C/EBP $\alpha$ -Isoform wirkt als partieller Antagonist, da die DNA-Bindungsdomäne des Proteins intakt, jedoch seine Fähigkeit zur Transaktivierung eingeschränkt ist (Lin F. T. et al. 1993, Lekstrom-Himes and Xanthopoulos 1998, Erickson et al. 2001). Zum Vergleich wurde das Expressionsplasmid für eine Mutante des Transkriptionsfaktors CREB (pCMV/CREB133) mit pGL2-1308 kotransfiziert. Bei dieser Mutante ist die Aminosäure Serin gegen Alanin ausgetauscht, wodurch eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors in der Position 133 nicht mehr möglich ist und damit die Transaktivierung verhindert wird (Alberts et al. 1994, Roesler et al. 1995). Sowohl p30 als auch CREB133 konkurrieren mit den entsprechenden endogenen, nativen Transkriptionsfaktoren um ihre DNA-Bindungsstellen.

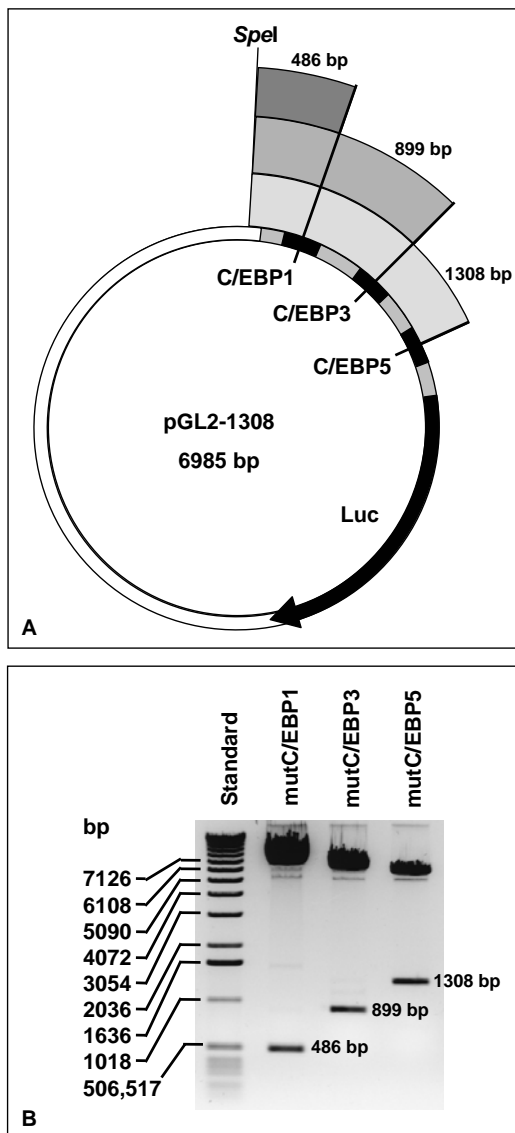
Im Reporter-gen-Assay hemmt p30 den cAMP-aktivierten IL-10 Promotor in THP-1 Zellen konzentrationsabhängig und vergleichbar mit CREB133 (Abb. 8A). Dies spricht dafür, dass die Bindung von C/EBP $\alpha$  ebenso zur cAMP-induzierten Transaktivierung beiträgt wie die Phosphorylierung von CREB. Der hemmende Effekt von p30 und CREB133 lässt sich durch steigende cAMP-Konzentrationen nur teilweise ausgleichen (Abb. 8B). Dabei erwies sich die Hemmung durch p30 als nachhaltiger.

### **5. 3. Die Mutation der C/EBP-Motive 1, 3 und 5 in der IL-10 Promotor/Enhancer-Region**

Um eine Beteiligung der C/EBP-Motive bei der cAMP-induzierten IL-10 Promotoraktivierung untersuchen zu können, wurden die drei C/EBP-Motive, für die eine Bindungsaktivität im EMSA nachgewiesen wurde, im IL-10 Reporter-gen-plasmid mutiert. Die Einzelmutanten wurden mit Hilfe des *GeneEditor<sup>TM</sup> in vitro Site-Directed Mutagenesis Systems* von Promega hergestellt. Durch einen EMSA wurde sichergestellt, dass die verwendeten Mutationsoligonukleotide kein C/EBP mehr binden können. Mit der Mutation eines C/EBP-Motives wurde gleichzeitig die Erkennungssequenz „GACTAGTC“ für die Restriktionsendonuklease *SpeI* eingeführt. Dadurch konnte mittels einer *SpeI*-Restriktionsspaltung der Erfolg der Einzelmutation überprüft werden (Abb 9). Ein 486, 899



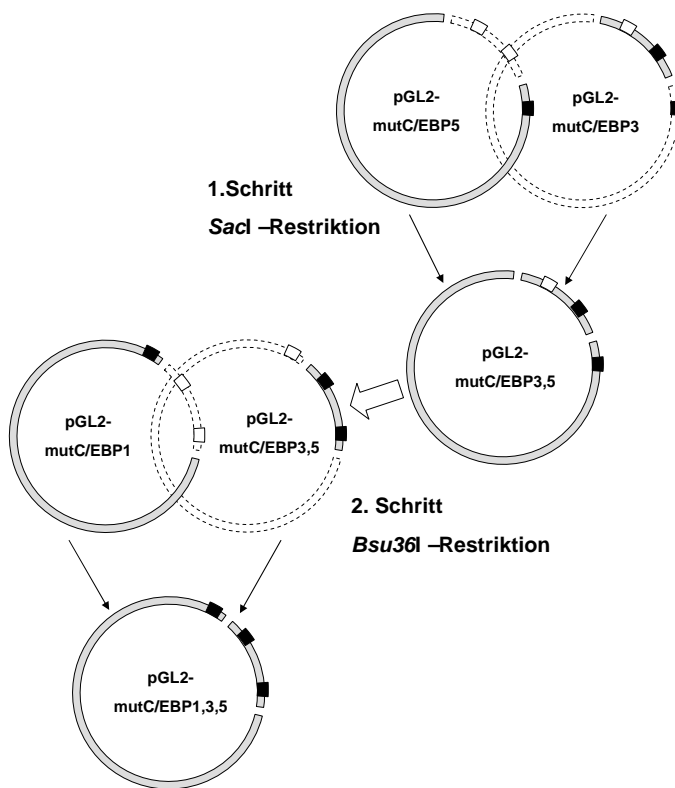
und 1308 bp-Fragment spricht für das Vorliegen der C/EBP1-, C/EBP3- bzw. C/EBP5-Mutante.



**Abb. 9: Identifizierung der Einzelmutanten pGL2-mutC/EBP1, 3 und 5.** **A:** Abstand (graue Flächen) der einzelnen C/EBP-Motive (schwarze Abschnitte) zur *SpeI*-Erkennungssequenz im Reportergenplasmid pGL2-1308. Bei Mutation eines C/EBP-Motives wird jeweils eine zusätzliche *SpeI*-Erkennungssequenz eingeführt. Das IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragment ist grau unterlegt und das Luciferasegen (Luc) durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. **B:** Gel-elektrophorese zur Auftrennung der Fragmente von pGL2-mutC/EBP1, 3 bzw. 5 nach einer *SpeI*-Restriktionsspaltung von 2,1 bzw. 0,5 µg Plasmid. Prüfung der Fragmentgrößen anhand eines DNA-Größenstandards (linke Spur).

Aus den C/EBP-Einzelmutanten wurde die Dreifachmutante pGL2-mutC/EBP1,3,5 in zwei Schritten hergestellt (Abb 10). Im ersten Schritt wurden die Einzelmutanten pGL2-mutC/EBP3 und 5 durch die Restriktionsendonuklease *SacI* gespalten und die entstandenen Fragmente (1187 und 5798 bp) im Agarose-Gel aufgetrennt. Die Fragmente mit einer Mutation wurden isoliert und nach Dephosphorylierung des mutC/EBP3-Fragmentes zu pGL2-mutC/EBP3,5 ligiert (Abb. 10). Durch eine *SpeI*-Kontrollspaltung mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der 409, 899 und 5677 bp-Fragmente konnte die

Doppelmutante pGL2-mutC/EBP3,5 mit gewünschter Fragmentorientierung identifiziert werden.



**Abb. 10: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Dreifachmutante pGL2-mutC/EBP1,3,5.** Nach Restriktionsspaltung werden gestrichelte Plasmidfragmente verworfen und graue ligiert. Native und mutierte C/EBP-Motive sind weiß bzw. schwarz hervorgehoben.

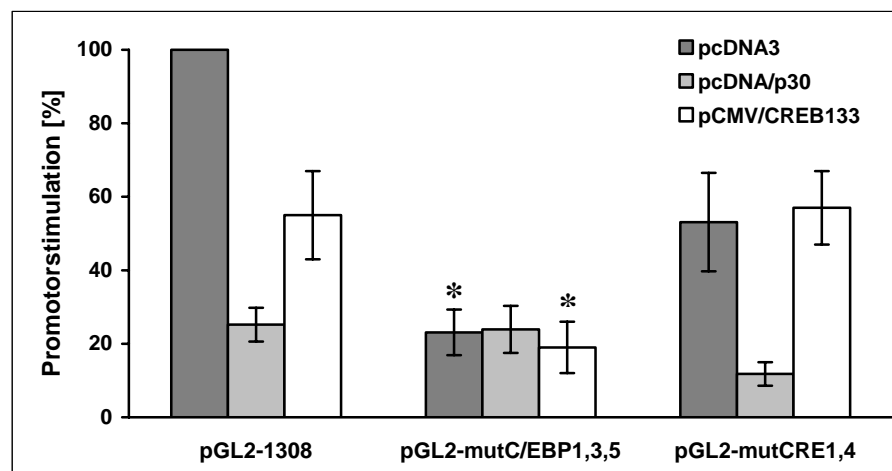
Dieses Zwischenprodukt und die Einzelmutante pGL2-mutC/EBP1 wurden im zweiten Schritt durch die Restriktionsendonuklease *Bsu36I* gespalten und die Fragmente (1222 und 5763 bp) wiederum im Agarose-Gel aufgetrennt. Wie im ersten Schritt werden die Fragmente mit Mutation isoliert, das mutC/EBP1-Fragment dephosphoryliert und mit dem mutC/EBP3,5-Fragment zu pGL2-mutC/EBP1,3,5 ligiert (Abb. 10). Da bei einer *SpeI*-Kontrollspaltung der Dreifachmutante pGL2-mutC/EBP1,3,5 die zu erwartenden Fragmentgrößen von 409, 413 und 486 bp im Agarose-Gel nicht zu trennen sind, wurde diese Mutante durch Sequenzierung überprüft.

#### **5. 4. Drei C/EBP-Motive sind in die cAMP-induzierte IL-10 Transkription in THP-1 Zellen involviert.**

Um eine Beteiligung der C/EBP-Motive an der cAMP-induzierten IL-10 Promotoraktivierung in THP-1 Zellen zu beweisen, wurde die Dreifachmutante pGL2-mutC/EBP1,3,5 im Reporteragen-Assay getestet (Abb.11). Dabei hat sich herausgestellt, dass sie nur noch über 23% der cAMP-Stimulierbarkeit des intakten Promotors verfügt. Eine zusätzliche Expression

von p30 hat keinen weiteren hemmenden Einfluss (24%). Die Expression von p30 hat erwartungsgemäß einen quantitativ ähnlichen Effekt auf die cAMP-Stimulierbarkeit des intakten Promotors (25%) wie die Mutation der drei C/EBP-Motive (Abb. 11). Beide Effekte sind nicht additiv und auf die verhinderte Bindung von C/EBP an die Motive C/EBP1, 3 und 5 zurückzuführen. Zum Vergleich wurde die Doppelmutante für die beiden CRE-Motive des Promotorfragmentes getestet. Ihre Stimulierbarkeit entspricht 53% der des intakten Promotors, was vergleichbar mit der Hemmung durch die Expression von CREB133 ist (55%) (Abb. 11). Wie p30 auf mutC/EBP1,3,5 zeigt auch CREB133 keinen zusätzlichen negativen Effekt auf die Aktivierung der CRE1,4 Promotor-Mutante (57%).

Im Gegensatz dazu reduziert die Expression von p30 die cAMP-Aktivierung der CRE1,4-Doppelmutante auf 12% der nativen Promotorstimulation. Umgekehrt ist jedoch die zusätzliche Hemmung durch CREB133 auf die Aktivierung der C/EBP-Dreifachmutante des Promotors nicht signifikant (19%) (Abb. 11).

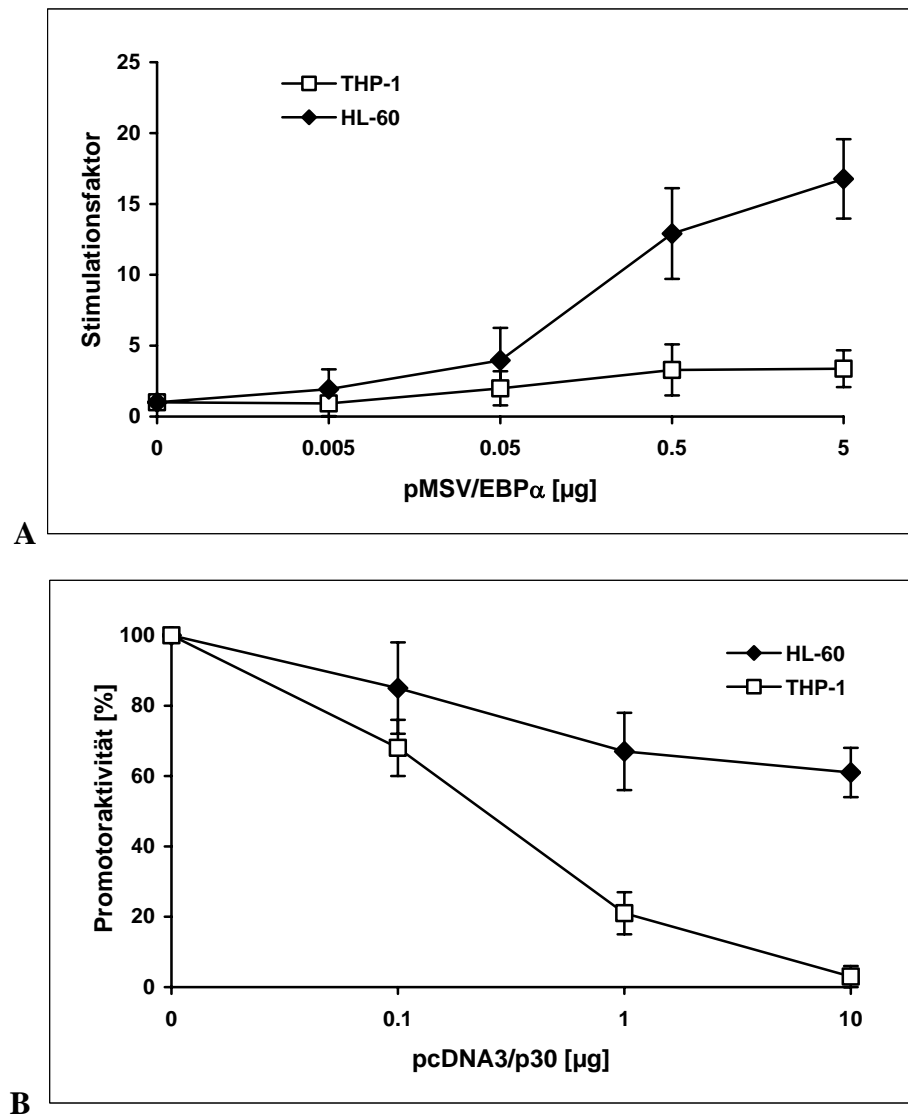


**Abb. 11: Einfluss der Mutation von C/EBP- und CRE-Motiven auf die cAMP-stimulierte IL-10 Promotoraktivierung in THP-1 Zellen** (nach Brenner et al. 2003).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  pGL2-Reportergenplasmid und gleichzeitig mit  $5 \mu\text{g}$  Expressionplasmid transfiziert und im Anschluss mit und ohne dbcAMP inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zelllysate bestimmt. Angegeben sind die Promotoraktivitäten sowie ihre Standardabweichung in Prozent bezogen auf die mittlere cAMP-Stimulation von pGL2-1308 bei pCMV- bzw. pcDNA3-Kotransfektion (100%) aus 5 unabhängigen Versuchen. Der Unterschied zwischen diesen Werten (\*) ist nicht signifikant.

Diese Daten zeigen, dass beide Transkriptionsfaktoren in die cAMP-induzierte Aktivierung des IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragmentes involviert zu sein scheinen, wobei die C/EBP-vermittelte Transaktivierung in THP-1 Zellen offenbar die entscheidendere Rolle spielt.

### 5. 5. Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$ ist an der konstitutiven IL-10 Promotoraktivität in THP-1 Zellen beteiligt.

Basierend auf dem Hinweis, dass die Transaktivierung durch C/EBP für eine Stimulation der IL-10 Transkription durch cAMP ausschlaggebend zu sein scheint, liegt die Vermutung nahe, dass die divergierende cAMP-Stimulierbarkeit von THP-1 und HL-60 Zellen mit ihrem erwiesenermaßen unterschiedlichen C/EBP-Gehalt zusammenhängt.

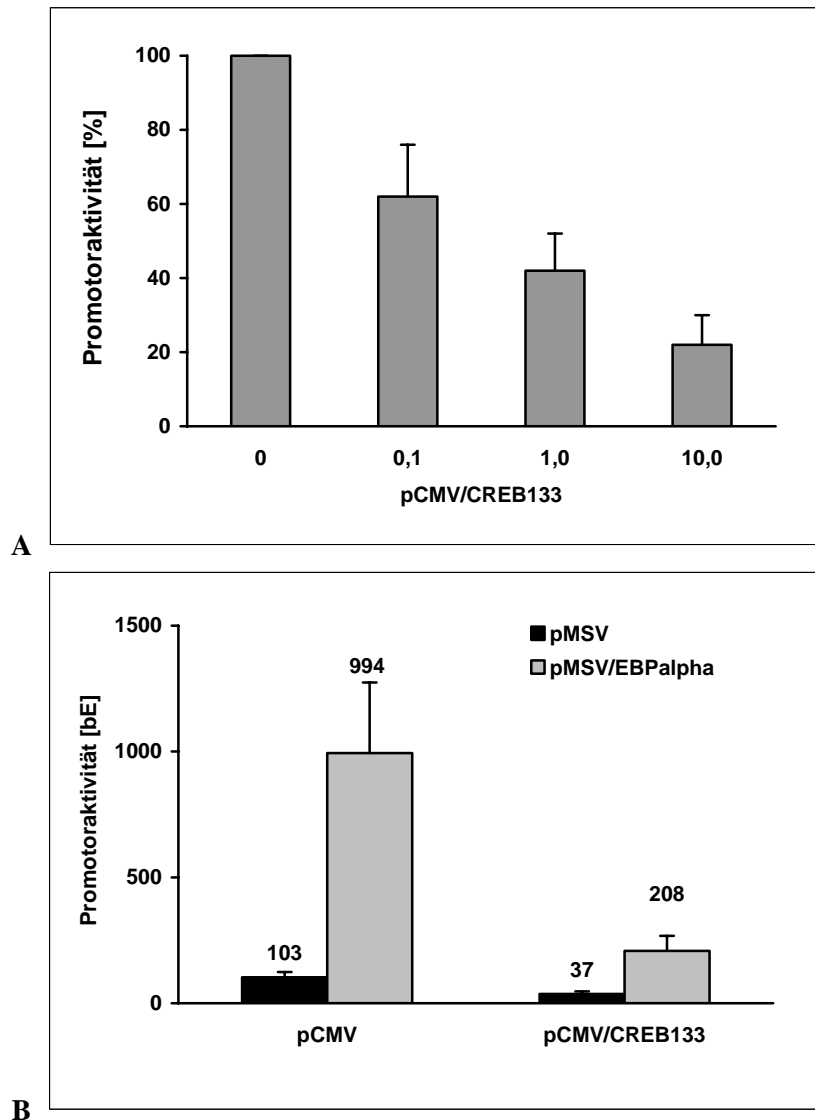


**Abb. 12: Einfluss von C/EBP $\alpha$  und p30 auf die konstitutive IL-10 Promotoraktivität in THP-1 und HL-60 Zellen** (nach Brenner et al. 2003).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 10  $\mu$ g pGL2-1308 Reporter-genplasmid und gleichzeitig mit 5  $\mu$ g Expressionplasmiden transfiziert und im Anschluss inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zelllysate bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. **A:** Stimulationsfaktor 1 entspricht der Promotoraktivität bei Kotretransfektion mit 5  $\mu$ g pMSV. **B:** Promotoraktivität bei Kotretransfektion mit 10  $\mu$ g pcDNA3 entspricht 100%. Unterschiedliche Plasmidmengen wurden mit pMSV (**A**) bzw. pcDNA3 (**B**) ausgeglichen.

Um zu überprüfen, ob der unterschiedliche C/EBP-Gehalt sich auch auf die konstitutive Promotoraktivität auswirkt, wurde exogenes C/EBP $\alpha$  bzw. die p30-Isoform in THP-1 und HL-60 Zellen exprimiert. Dazu wurden steigende Konzentrationen der Expressionsplasmide pMSV/EBP $\alpha$  und pcDNA3/p30 mit dem Reportergenplasmid pGL2-1308 kotransfiziert und die Zellen nicht mit cAMP stimuliert (Abb. 12A). Dabei wurde deutlich, dass exogenes C/EBP $\alpha$  die IL-10 Promotor/*Enhancer*-Aktivität in THP-1 Zellen nur geringfügig verstärkt (max. 3,4-fach), jedoch in HL-60 Zellen zu einer Erhöhung bis auf das 17-fache führt. Umgekehrt lässt sich die unstimulierte Promotoraktivität in THP-1 Zellen stärker durch p30 hemmen (auf 3%) als in HL-60 Zellen (auf 61%) (Abb. 12B).

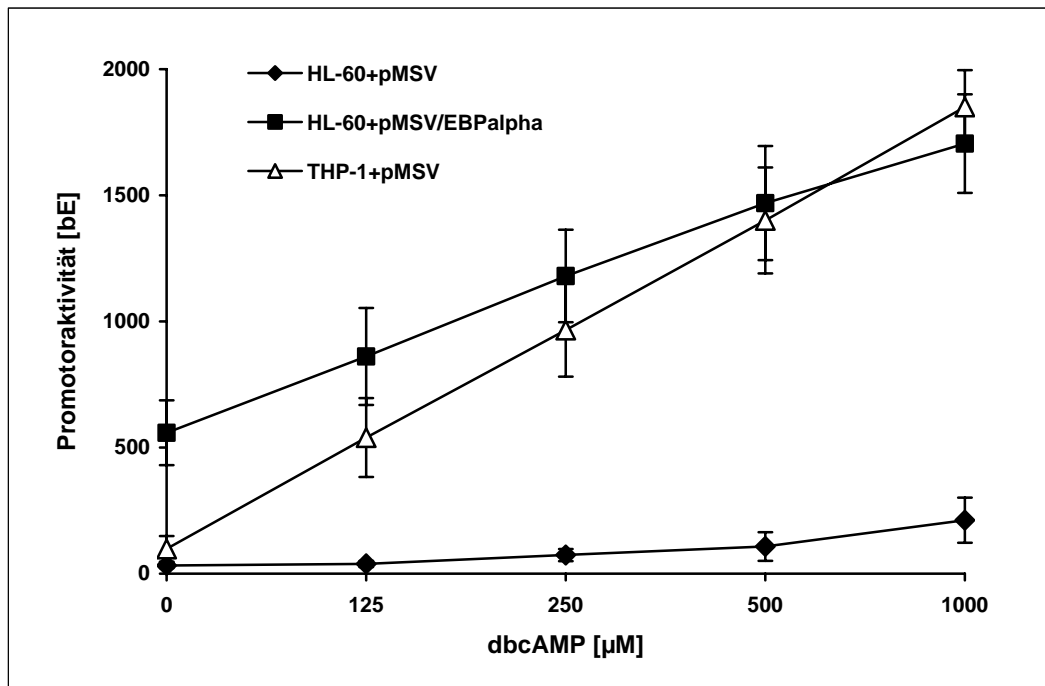
#### **5. 6. Die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$ und CREB sind zur konstitutiven und stimulierten IL-10 Promotoraktivierung notwendig.**

Es galt nun zu klären, ob die C/EBP-bedingte, konstitutive IL-10 Promotoraktivität an eine CREB-Phosphorylierung gebunden ist. Dazu wurde der Einfluss von CREB133 auf die Luciferase-Aktivität des nativen Promotorkonstruktes in unstimulierten THP-1 Zellen untersucht (Abb. 13A). Es zeigt sich, dass steigende Konzentrationen von pCMV/CREB133 die unstimulierte Promotoraktivität hemmen (22%). Demzufolge hat sowohl C/EBP als auch konstitutiv phosphoryliertes CREB Anteil an der basalen Promotoraktivität in THP-1 Zellen. In ähnlicher Weise wird auch die exogen C/EBP-induzierte Promotoraktivität in HL-60 Zellen (9,7-fach) durch die Koexpression von CREB133 gehemmt (5,6-fach) (Abb. 13B).



**Abb. 13: Einfluss von CREB133 auf die konstitutive bzw. die C/EBP $\alpha$ -induzierte IL-10 Promotoraktivität** (nach Brenner et al. 2003). **A:** THP-1 Zellen. **B:** HL-60 Zellen.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  pGL2-1308 Reportergenplasmid und gleichzeitig mit  $10 \mu\text{g}$  (**A**) bzw.  $5 \mu\text{g}$  (**B**) Expressionplasmid transfiziert und im Anschluss inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zelllysate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 7 unabhängigen Versuchen. Die Promotoraktivität bei Kotretransfektion mit  $10 \mu\text{g}$  pCMV entspricht 100% (**A**).

Um zu verifizieren, dass die mangelhafte C/EBP-Expression in HL-60 Zellen Ursache der schwächeren cAMP-Stimulierbarkeit des IL-10 Promotors ist, wurde der Transkriptionsfaktor durch transiente pMSV/C/EBP $\alpha$ -Transfektion substituiert und die cAMP-Stimulierbarkeit im Vergleich mit THP-1 und nativen HL-60 ermittelt (Abb. 14).



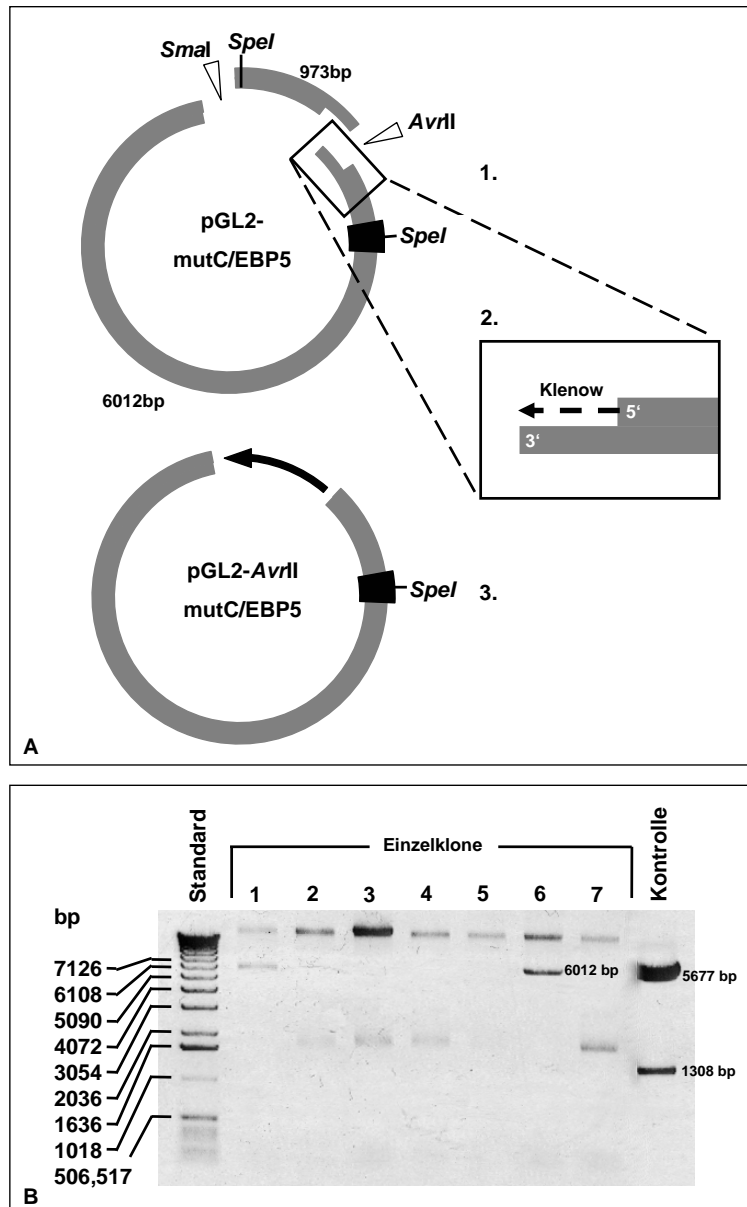
**Abb. 14: Die cAMP-Stimulierbarkeit bei C/EBP $\alpha$ -Substitution in HL-60 Zellen** (nach Brenner et al. 2003).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 10  $\mu$ g pGL2-1308 Reportergenplasmid und gleichzeitig mit 5  $\mu$ g Expressionplasmid transfiziert und mit und ohne cAMP inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zelllysats bestimmt. Die Mittelwerte der Promotoraktivitäten sowie die Standardabweichung aus 10 unabhängigen Experimenten sind graphisch dargestellt.

Mit steigenden cAMP-Konzentrationen kann der IL-10 Promotor in nativen HL-60 erwartungsgemäß nur schwach (211 bE) im Vergleich zu THP-1 Zellen (1850 bE) aktiviert werden. Bei Expression von exogenem C/EBP in HL-60 Zellen wird jedoch mit cAMP eine ähnliche Promotoraktivität wie in THP-1 Zellen (1705 bE) erreicht.

### 5. 7. Die Herstellung der Mutante pGL-2AvrIImutC/EBP5

Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors C/EBP an der IL-10 Promotoraktivierung legt die Vermutung nahe, dass die beobachtete Restaktivität der Deletionsmutante pGL2-376 (Abb. 4) (Platzer et al. 1999) auf das C/EBP5-Motiv zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde eine äquivalente Deletionsvariante des Promotors mit Mutation des C/EBP5-Motives geschaffen. Dazu wurden aus pGL2-mutC/EBP5 973 bp vom 5'Ende des IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragmentes mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Avr*II heraus gespalten. Das verbleibende Plasmidfragment wurde aus der Gelelektrophorese isoliert und der 3'Überhang am *Avr*II-Restriktionsende für eine *blunt-end*-Ligation zu pGL2-*Avr*IImutC/EBP5 aufgefüllt. (Abb. 15A). Durch eine Kontrollspaltung mit *Spe*I wurde die erfolgreiche Deletion überprüft (Abb. 15B). pGL2-*Avr*IImutC/EBP5 verfügt noch über eine *Spe*I-Erkennungssequenz im mutierten C/EBP5-Motiv und lässt sich folglich

linearisieren, ohne dass ein weiteres Fragment wie bei der *SpeI*-Restriktionsspaltung von pGL2-mutC/EBP5 (Abb. 15B, Kontrolle) entsteht. Demzufolge liegt bei Klon 6 das erwünschte Konstrukt pGL2-*AvrII*mutC/EBP5 vor (Abb. 15B).



**Abb. 15 Herstellung (A) und Identifizierung (B) von pGL2-*AvrII*mutC/EBP5.**

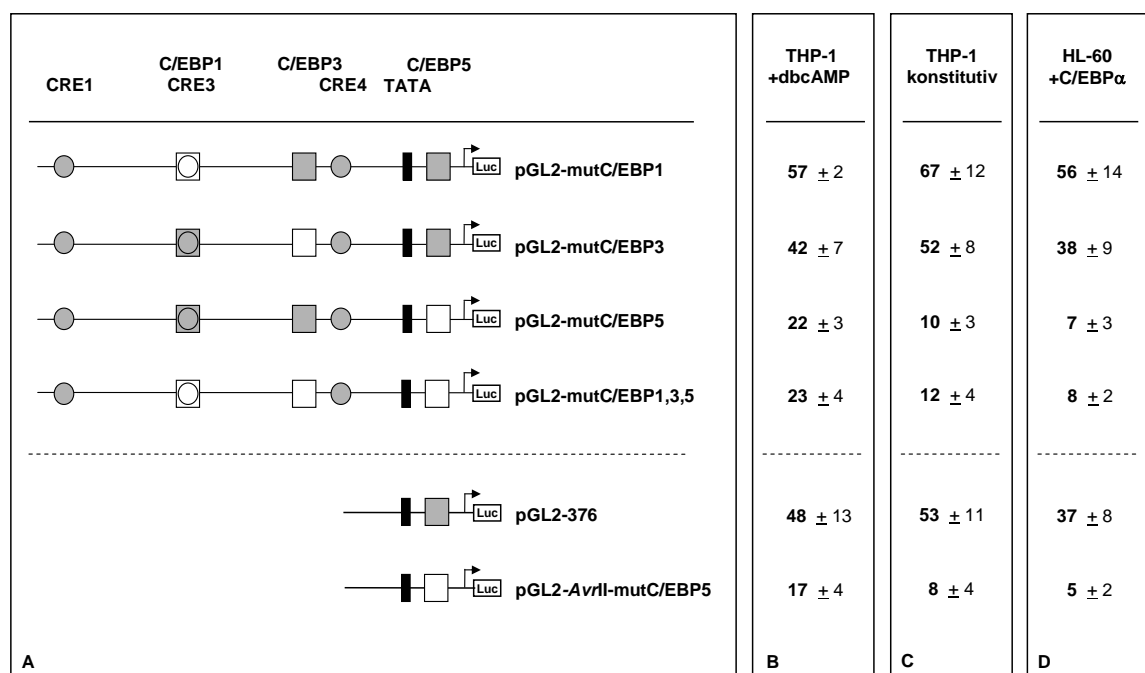
**A:** 1. *SmaI/AvrII*-Restriktionsspaltung, 2. Auffüllen des 3'Überhangs und 3. *blunt-end*-Ligation. Das mutierte C/EBP5-Motiv ist schwarz hervorgehoben. **B:** Gelelektrophorese zur Auftrennung der Plasmidfragmente nach einer *SpeI*-Restriktionsspaltung von Plasmidpräparationen aus 7 Einzelklonen bzw. 0,5 µg pGL2-mutC/EBP5 als Kontrolle (rechte Spur). Prüfung der Fragmentgrößen anhand eines Standards (linke Spur).

### 5. 8. Die einzelnen C/EBP-Motive der IL-10 Promotor/Enhancer-Region haben unterschiedlichen Anteil an der IL-10 Transkription.

Um den funktionellen Einfluss jedes einzelnen der drei C/EBP-Motive, sowohl auf die stimulierte als auch auf die konstitutive Promotoraktivität zu erfassen, wurden die Einzelmutanten (pGL2-mutC/EBP1, 3 bzw. 5) des Reportergenplasmids getestet. In Abb. 16 sind mutierte Promotorfragmente schematisch und im Zusammenhang mit ihrer ermittelten



prozentualen Restaktivität in Bezug auf das native Fragment (pGL2-1308) dargestellt. Die Mutation des C/EBP5-Motivs, das den geringsten Abstand zum Translationsstartpunkt hat, reduziert die cAMP-induzierte Promotoraktivität auf 22%, während die Mutationen von C/EBP3 und 1 dieselbe nur auf 42% bzw. 57% reduzieren (Abb. 16B). Die Promotoraktivität nach Mutagenese aller drei C/EBP-Motive (pGL2-mutC/EBP1,3,5) war mit der nach alleiniger Mutation von C/EBP5 vergleichbar (23%, siehe auch Abb. 8). Das verkürzte Promotorfragment (pGL2-376), bestehend aus 376 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes, ohne die Motive C/EBP1 und 3 sowie CRE1 und 4, zeigt noch 48% Restaktivität.



**Abb. 16: Stimulierte und konstitutive Aktivität von IL-10 Promotor/Enhancer-Mutanten in Monozyten** (nach Brenner et al. 2003).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 10  $\mu$ g pGL2- Reportergenplasmid und ggf. mit Expressionsplasmid transfiziert, anschliessend mit bzw. ohne cAMP inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zelllysate bestimmt. **A:** IL-10 Promotor/Enhancer-Fragmente mit nativen (grauen) und mutierten (weißen) CRE(Kreisen)- und C/EBP(Quadraten)-Motiven getesteter Reportergenplasmide. **B:** cAMP-stimulierte und **C:** konstitutive Aktivität der Mutanten in THP-1 Zellen sowie **D:** bei exogener C/EBP Expression in HL-60 Zellen jeweils bezogen auf die des nativen Promotor/Enhancer-Fragmentes (100%). Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 unabhängigen Experimenten sind zusammengefasst.

Die Mutation des C/EBP5-Motivs auf einem Fragment ähnlicher Länge (pGL2-AvrII-mutC/EBP5 mit 397 bp) reduziert die cAMP-Stimulierbarkeit auf 17% des nativen Promotors. Diese Ergebnisse unterstreichen die funktionell dominante Rolle des C/EBP5-Motivs bei der cAMP-stimulierten Aktivierung der IL-10 Transkription. Bei der konstitutiven Promotoraktivität wird die Funktion des C/EBP5-Motivs noch deutlicher. Seine

Mutation führt zu einer Reduktion auf 10%, wogegen die Mutation von C/EBP3 und 1 eine vergleichsweise geringe Hemmung (auf 52 und 67%) bewirken (Abb. 16C). Die simultane Mutation der drei C/EBP-Motive zeigt keinen additiven Effekt (12%) und bei den Deletionsmutanten pGL2-376 und pGL2-AvrII<sup>mut</sup>C/EBP5 ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie für die cAMP-induzierte Promotoraktivität. Die 376 bp machen allein 53% der konstitutiven Promotoraktivität, die bei Mutation des Motivs auf 8% reduziert wird, aus (Abb. 16C). An der durch exogenes C/EBP vermittelten IL-10 Promotoraktivierung in HL-60 Zellen hat ebenfalls das C/EBP5-Motiv den größten Anteil. Seine Mutation hemmt die Transaktivierung auf 7%, wogegen bei der Mutation von C/EBP3 und 1 noch 38% bzw. 56% des ursprünglichen C/EBP-Effektes verbleiben. Bei kombinierter Mutation der drei C/EBP-Motive ergibt sich auch hier keine summarische Hemmung, die über die der C/EBP5-Mutation hinausginge. Bei Deletion aller übrigen Motive kann C/EBP5 immer noch 37% der C/EBP-Transaktivierung realisieren, die bei seiner Mutation auf 5% fällt (Abb. 16D).

## **6. DISKUSSION**

### **6. 1. Die Beteiligung von C/EBP an der monozytären IL-10 Transkription**

Die vorliegenden Ergebnisse sind ein Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise des IL-10 Promotors in Monozyten. Es wurde gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie durch die Bindung an drei Motive in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region an der Transkription des IL-10 Gens beteiligt sind. Die Bindung der Transkriptionsfaktor-Isoformen C/EBP $\alpha$  und  $\beta$ , die in THP-1 Zellen exprimiert werden, konnte direkt mit entsprechenden Antikörperseren im EMSA demonstriert werden. Darüber hinaus liegt die Vermutung nahe, dass auch C/EBP $\delta$  und andere Isoformen an die C/EBP-Motive der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region binden können, denn es ist bekannt, dass die DNA-Bindungsdomäne innerhalb dieser Transkriptionsfaktorfamilie und besonders zwischen den Isoformen C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  stark konserviert ist (McKnight 2001). Funktionelle Untersuchungen der exogenen C/EBP $\beta$ -Expression in Monozyten führten am IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragment zu mit der  $\alpha$ -Isoform vergleichbaren Ergebnissen (Diese Daten wurden hier nicht aufgenommen).

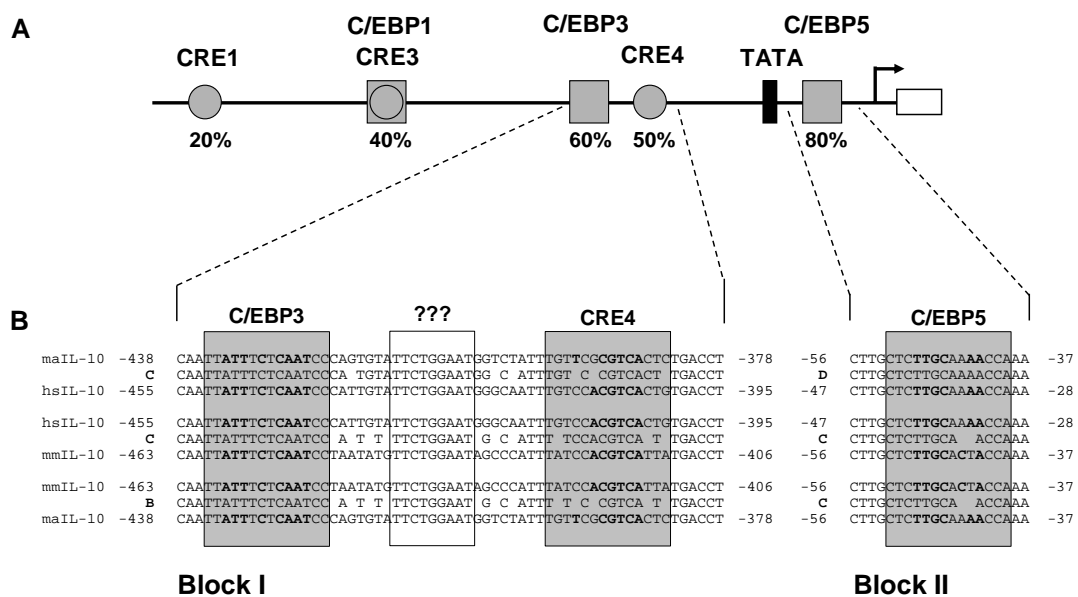
#### **6.1.1. Die C/EBP-Motive in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region**

Interessanterweise hat sich bei der Suche nach C/EBP-bindenden Elementen in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region herausgestellt, dass das putative CRE3-Motiv, trotz seiner größeren Homologie zur CRE-Konsensus-Sequenz (Tab. 1), Faktoren der C/EBP- statt der CREB/ATF-Familie bindet. Die Bindung von C/EBP an CRE-Motive bzw. die funktionelle Substitution von CREB durch Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie ist bereits in der Literatur beschrieben (Bakker and Parker 1991, Tsukada et al. 1994). Die simultane Bindung von C/EBP $\alpha$  und ATF konnte an CRE1 nachgewiesen werden. Das CRE3-Motiv enthält trotz seiner Homologie zur CRE-Konsensus-Sequenz nicht das für eine CREB- oder ATF-Bindung essentielle Pentamer „CGTCA“ (Mayr and Montminy 2001). Entsprechend wurde eine Bindung von CREB bzw. ATF an das Motiv nicht eindeutig nachgewiesen und das Element galt als funktionslos (Platzer et al. 1999), bis es hier als C/EBP-Motiv durch die gezielte Verwendung eines C/EBP $\alpha$ -Antikörpers identifiziert wurde. Durch den Austausch von sieben Basenpaaren (mutC/EBP1) konnte die Bindung von C/EBP verhindert, der Aktivierungsanteil

des Motivs ermittelt und so der Verlust der cAMP-Stimulierbarkeit des 520 bp Promotor/*Enhancer*-Fragmentes erklärt werden (Platzer et al. 1999).

### 6.1.2. Die funktionelle IL-10 Promotor/*Enhancer*-Struktur

Den drei einzelnen C/EBP-Motiven ist ein unterschiedlich großer Anteil an der cAMP-bedingten Transaktivierung zuzuordnen. Die prozentualen Aktivierungsanteile der C/EBP- und CRE-Motive bei der cAMP-stimulierten IL-10 Transkription sind in Abb. 17A schematisch zusammengefasst.



**Abb. 17: Anteile der CRE- und C/EBP-Motive an der cAMP-stimulierten IL-10 Transkription innerhalb und außerhalb evolutionär konservierter Bereiche** (nach Brenner et al. 2003). **A:** CRE(Kreise)- und C/EBP(Quadrate)-Motive im IL-10 Promotor/*Enhancer*-Fragment mit ihrem prozentualen Aktivierungsanteil bei der cAMP-Stimulation in THP-1 Zellen. **B:** Blöcke hoher Homologie (B, 70-80%; C, 80-90%; D 90-100%) zwischen humaner (hs), muriner (mm) sowie *M. monax* (ma) in der 1,5 kb Sequenz stromaufwärts vom IL-10 Translationsstart, ermittelt durch den DBA. Nukleotide der TFBS (grau unterlegt), die mit der entsprechenden Konsensus-Sequenz übereinstimmen, sind fett gedruckt.

Der Abstand der Motive zur TATA-Box korreliert mit dem jeweiligen Transaktivierungspotential: Je näher ein Motiv an der TATA-Box lokalisiert ist, desto größer ist sein Anteil an der Promotoraktivierung. Ein solcher Zusammenhang ließe sich zum Beispiel durch das Vertauschen der einzelnen Motive überprüfen. Diese Analysen könnten Aufschluss darüber geben, inwiefern die Motive der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region lokalisations- bzw. kontextabhängig funktionieren. Wenn auch die hier vorliegenden Ergebnisse zu den Aktivierungspotentialen der einzelnen Motive auf eine Abhängigkeit

Abstand zur TATA-Box hindeuten, so ist in anderen Fällen die Abhängigkeit vom Kontext einer ganzen Region bekannt (Fry and Farnham 1999).

Die prozentualen Anteile der jeweiligen Motive an der IL-10 Transkription machen deutlich, dass die C/EBP- und CRE-Motive nicht additiv funktionieren, denn ihre Summe ergibt mehr als 100%. Vielmehr scheinen die Motive in Form einer hierarchischen Abhängigkeit voneinander zu aktivieren. So ist die Mutation des C/EBP5-Motivs ausreichend, um eine Funktion aller stromaufwärts gelegenen Elemente zu verhindern und bei Mutation von C/EBP3 bzw. CRE4 entspricht die Transaktivierung quantitativ einer Deletion dieser und aller 5'gelegenen Bereiche. Die Funktion des C/EBP3-Motivs setzt also die Bindung von C/EBP an C/EBP5 voraus und die Funktion von C/EBP1 scheint wiederum von der C/EBP3-Aktivierung abhängig zu sein. Dadurch erlangen die TATA-Box-nahen Motive besonderen Einfluss und es ist somit nicht verwunderlich, dass genau jene evolutionsbiologisch konserviert wurden. Mit einem *DNA-Block-Aligner* wurden die humane, die murine sowie die IL-10 Promotor/*Enhancer*-Sequenz von *Marmota monax* (Murmeltier) jeweils paarweise auf Homologien von Frau Dr. Ulrike Gausmann (IMB, Jena) untersucht. Bei allen drei Vergleichen zeigten sich jeweils zwei DNA-Blöcke mit hoher Sequenzhomologie. Block I umfasst dabei die Motive CRE4 und C/EBP3, wogegen Block II das C/EBP5-Motiv enthält (Abb. 17B).

Bei dem C/EBP5-Motiv, welches 41 bp stromabwärts der TATA-Box liegt (Abb. 17A), spielt möglicherweise die Interaktion von C/EBP mit dem basalen Initiationskomplex der Transkription eine Rolle, denn Wechselwirkungen mit dem TBP und dem Faktor TFIIB wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (Nerlov and Ziff 1995, Pedersen et al. 2001). Eine solche Interaktion würde auch die vergleichsweise starke Restaktivität des 376 bp Promotor/*Enhancer*-Fragmentes erklären.

Die Aktivierungsanteile der Motive C/EBP3 und CRE4 in Block I sind miteinander vergleichbar (Abb. 17A). Hier ist eine Interaktion der Transkriptionsfaktoren CREB und C/EBP aufgrund der engen Lagebeziehung ihrer Motive durchaus denkbar (Brenner et al. 2003). Innerhalb des Block I ist zwischen den Motiven C/EBP3 und CRE4 außerdem eine 9 bp Sequenz (5'TTCTGGAAT3') in allen drei Spezies vollständig konserviert. Es stellt sich deshalb die Frage, inwiefern hier ein funktionell relevantes Element vorliegt. Die neun Basenpaare könnten für die Interaktion von CREB und C/EBP eine essentielle Voraussetzung sein, indem sie eine sequenzabhängige 3D-Struktur bilden oder eine weitere kooperierende TFBS darstellen.

### 6.1.3. C/EBP in der cAMP/PKA-abhängigen Aktivierung der IL-10 Transkription

Über diese Ergebnisse zur funktionellen IL-10 Promotor/*Enhancer*-Struktur hinaus wurden mit den hier vorliegenden Daten die Beobachtungen vieler Autoren hinsichtlich der Charakterisierung der C/EBP-Transkriptionsfaktoren bestätigt. Einmal mehr ist eine Beteiligung von C/EBP an einer cAMP-vermittelten Signaltransduktion beschrieben, ohne dass eine Phosphorylierung durch die PKA bekannt wäre. In der Literatur wird die cAMP-abhängige C/EBP-Transaktivierung durch eine verstärkte cAMP-induzierte C/EBP-Expression einerseits sowie eine verstärkte cAMP-abhängige C/EBP-Translokation in den Zellkern andererseits erklärt (Metz and Ziff 1991, Berrier et al. 1998, Pelletier et al. 1998). Darüber hinaus geht jedoch aus Struktur-Funktionsanalysen hervor, dass C/EBP-Transkriptionsfaktoren, trotz Ermangelung einer PKA-Phosphorylierungsposition, mit den Aminosäuren 52-124 über eine cAMP-aktivierbare Domäne verfügen (Nerlov and Ziff 1994, 1995). Aufgrund dessen wird die Existenz eines Kofaktors vermutet, der mit dieser cAMP-sensitiven Domäne von C/EBP interagiert, nachdem er selbst direkt oder indirekt durch die PKA aktiviert wurde (Tae et al. 1995, Roesler 2000, Wilson et al. 2001, Wilson and Roesler 2002). Ein interessanter Kandidat ist das CBP (*CREB Binding Protein*)/p300, das bekanntermaßen als Kofaktor an phosphoryliertes CREB bindet. Neben der CREB-Bindungsdomäne, die sich über die Aminosäuren 552-660 erstreckt, verfügt das Protein zusätzlich über eine Bindungsdomäne für C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  (Aminosäuren 1752-1859) (Mink et al. 1997). Da sich CREB und C/EBP-Bindungsdomänen nicht überlagern, kommt CBP/p300 als Kofaktor und brücken-bildender Mediator zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren in Betracht. Eine solche funktionelle CBP/p300 Brücke wurde bereits zwischen den Transkriptionsfaktoren v-Myb und C/EBP $\beta$  beschrieben. Dabei interagiert v-Myb mit CBP/p300 an der CREB Bindungsdomäne von CBP/p300 (Mink et al. 1997). Eine derartige Interaktion von CBP/p300 mit CREB und C/EBP wurde bisher noch nicht beschrieben und ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen an der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region. Möglicherweise reagieren differenzierte Monozyten auf eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit einem Zusammenspiel mehrerer Mechanismen: mit verstärkter C/EBP-Expression, -Translokation und -DNA-Bindung, CREB-Phosphorylierung, Kofaktoraktivierung sowie Protein-Protein-Interaktionen und daraus resultierend mit verstärkter IL-10 Transkription (Vinson et al. 1989, Metz and Ziff 1991, Tae et al. 1995, Roesler 2001).

#### **6.1.4. Die C/EBP-vermittelte konstitutive IL-10 Promotor/Enhancer-Aktivität**

Aus Struktur-Funktionsanalysen ist bekannt, dass C/EBP neben dem cAMP-abhängig aktivierenden Bereich auch über konstitutiv aktivierende Regionen (Aminosäuren 55-86 und 175-217) verfügt, die vermutlich mit dem TBP und dem Kofaktor TFIIB interagieren (Roesler et al. 1998, Wilson and Roesler 2002). Entsprechend wurde in THP-1 Zellen eine konstitutive IL-10 Promotoraktivität, die auf eine cAMP-unabhängige C/EBP-Transaktivierung zurückzuführen ist, mit Hilfe des C/EBP-Antagonisten p30 ermittelt (Abb. 12B). Bei dieser Isoform sind die Aminosäuren 1-117 und damit eine der beiden konstitutiv aktivierenden Regionen sowie ein Großteil der überlagernden cAMP-sensitiven Regionen deletiert. Die Tatsache, dass sich konstitutiv und cAMP-abhängig transaktivierende Domänen des Transkriptionsfaktors überlagern, deutet darauf hin, dass sich beide Aktivitäten in gewisser Weise bedingen. Entsprechend geht aus den Kotransfektionsversuchen mit dem CREB-Antagonisten CREB133 hervor, dass die C/EBP-bedingte, konstitutive Promotoraktivität zum großen Teil von der CREB-Phosphorylierung abhängig ist (Abb. 13A). Offenbar kommt es hier bei der cAMP-unabhängigen IL-10 Promotoraktivierung zu einer Kooperation von C/EBP mit konstitutiv phosphoryliertem CREB. Demzufolge ist eine Kooperation beider Transkriptionsfaktoren nicht nur für eine maximale stimulierte, sondern auch für die konstitutive IL-10 Promotor/Enhancer-Aktivierung in THP-1 Zellen essentiell.

### **6. 2. Die Bedeutung von C/EBP in der differenzierungsabhängigen, zell- und gewebsspezifischen IL-10 Genregulation**

Die Verfügbarkeit spezifischer Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung von Promotoren kann Voraussetzung für eine zell- und gewebsspezifische sowie differenzierungsabhängige Genregulation sein.

Die IL-10 Promotoraktivierung in der myelo-monozytären Vorläufer-Zelllinie HL-60, die kaum nachweisbare Mengen C/EBP enthält (Prosch et al. 2001), ist stark beeinträchtigt. Jedoch lässt sich der IL-10 Promotor in HL-60 Zellen erheblich durch exogenes C/EBP aktivieren. Durch die Substitution von C/EBP in HL-60 Zellen konnte eine mit prä-monozytären THP-1 Zellen vergleichbare cAMP-Stimulation der IL-10 Transkription erreicht werden. Der differenzierungsbedingte C/EBP-Mangel in HL-60 Zellen ist demzufolge eine Ursache für die unzulängliche Promotoraktivierung durch cAMP.

Am Beispiel der HL-60 und THP-1 Zelllinien wurde gezeigt, dass die Transkription des IL-10 Gens durch die Beteiligung von C/EBP in Monozyten differenzierungsabhängig reguliert werden kann. Ein wesentlicher Faktor zur Monozytendifferenzierung ist GM-CSF, das bei

Entzündung von Makrophagen, T<sub>H</sub>1-Zellen sowie Fibroblasten produziert wird. Da sich der C/EBP-Gehalt in Monozyten mit zunehmender Differenzierung erhöht, kann auch die IL-10 Transkription zunehmend aktiviert werden. An diesem Beispiel lässt sich das immunmodulatorische Potential von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren erklären (Hartung 1999). IL-10 seinerseits hemmt wiederum die GM-CSF-Produktion (Moore et al. 2001). Daraus ergibt sich ein verzögerter auto-regulatorischer *Feedback*-Mechanismus: Mit zunehmender Entzündung differenzieren Monozyten durch die Wirkung von GM-CSF aus und können verstärkt IL-10 sezernieren, wodurch die Produktion von GM-CSF und damit die Monozytendifferenzierung wiederum gehemmt werden.

*In vitro* differenzieren Monozyten auch in Gegenwart von Vitamin D<sub>3</sub> (Schwende et al. 1996). C/EBP Gene lassen sich jedoch ebenso direkt durch IL-1 $\beta$ , Glukokortikoide bzw. durch cAMP aktivieren (Akira and Kishimoto 1997, Berrier et al. 1998, Pelletier et al. 1998, Robb et al. 2002).

Im Hinblick auf die zellspezifische IL-10 Genregulation liegt es nahe, bei der Untersuchung der IL-10 Produktion in verschiedenen Zellen, wie z.B. B-Zellen oder Keratinozyten, ihren C/EBP-Gehalt mit in Betracht zu ziehen. Zum Beispiel konnte die IL-10 Transkription in einer T-Zelllinie nicht durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration stimuliert werden (Riese et al. 2000). Möglicherweise ist dies auf unzureichende Mengen C/EBP in den T-Zellen zurückzuführen.

Die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren wurde im Rattenlebergewebe entdeckt (McKnight 2001) und die Leber gilt als eine Hauptquelle für systemisches IL-10 (Emmanuilidis et al. 2001). Bei lokalem ischämischen Gewebsuntergang, zum Beispiel während kardio-pulmonaler Bypassoperationen, kommt es mit der Reperfusion des Gewebes zu einer Entzündungsreaktion, die eine postoperative Komplikation darstellt. Die Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-8 aus dem Myokard korreliert mit der Dauer der kardialen Ischämie und kann zum systemischen Entzündungssyndrom führen. Kompensatorisch kommt es zur Freisetzung von IL-10 hauptsächlich aus der Leber (Wan et al. 1997a, Wan et al. 1997b, 1997c). IL-10 wird von Kupffer-Zellen und hepatischen Sternzellen produziert (Knolle et al. 1995a, Knolle et al. 1995b, Wang S. C. et al. 1998). Aber auch die hepatozytäre IL-10 Expression wurde bei einer murinen Zelllinie beschrieben (Ishizaka et al. 1996). Aufgrund der hier dargelegten Erkenntnisse über die Transkriptionsregulation von IL-10 ist es durchaus denkbar, dass die Faktoren der C/EBP-Familie eine entscheidende Rolle bei der Expression dieses Zytokins im Lebergewebe spielen. Die Leber nimmt im Immunsystem eine besondere Stellung ein. Zu Beginn einer Immunreaktion werden von Hepatozyten die Akute-Phase-



Proteine gebildet. Diese Reaktion wird durch Zytokine reguliert. IL-6 leitet dabei die Akute-Phase-Reaktion ein, wogegen IL-10 sie limitiert (Knolle et al. 1995a, Knolle et al. 1995b). Bei relativem intrahepatischen IL-10 Mangel kommt es zum Zelluntergang mit fibrotischem Umbau des Gewebes. Das hepatische IL-10 unterstützt mit seinen anti-inflammatorischen Eigenschaften ein immunsuppressives Milieu und damit das immunologische Privileg der Leber (Jahr and Wolff 1989). Die biologische Notwendigkeit liegt in der Position des Organs im Blutkreislauf. Über die *Vena portae* wird die Leber ständig mit den Allogenen und Toxinen aus dem Verdauungstrakt überflutet. Endotoxin-Konzentrationen, wie sie physiologischer Weise in der *Vena portae* zu finden sind, aktivieren u. a. die IL-10 Produktion der Leber (Knolle et al. 1998a, Knolle et al. 1998b). Durch eine feinstufige Immunregulation wird der größtmögliche Schutz gewährleistet und gleichzeitig ein inflammatorischer Begleitschaden verhindert. Die IL-10-bedingte Hemmung der Antigenpräsentation schränkt die T-Zellaktivierung und besonders die zelluläre Immunreaktion der Leber stark ein. Einerseits ermöglicht dies ein verlängertes Überleben von histo-inkompatiblen Gewebe. Das heißt, ein Lebertransplantat kann potentiell besser toleriert werden, als das Transplantat eines nicht immunologisch privilegierten Organs. Andererseits können Viren in einem immunologisch privilegierten Organ mit eingeschränkter T-Zellaktivierung gut persistieren.

#### **6.2.1. Die Bedeutung der C/EBP-CREB-Interaktion bei Stress und Entzündung**

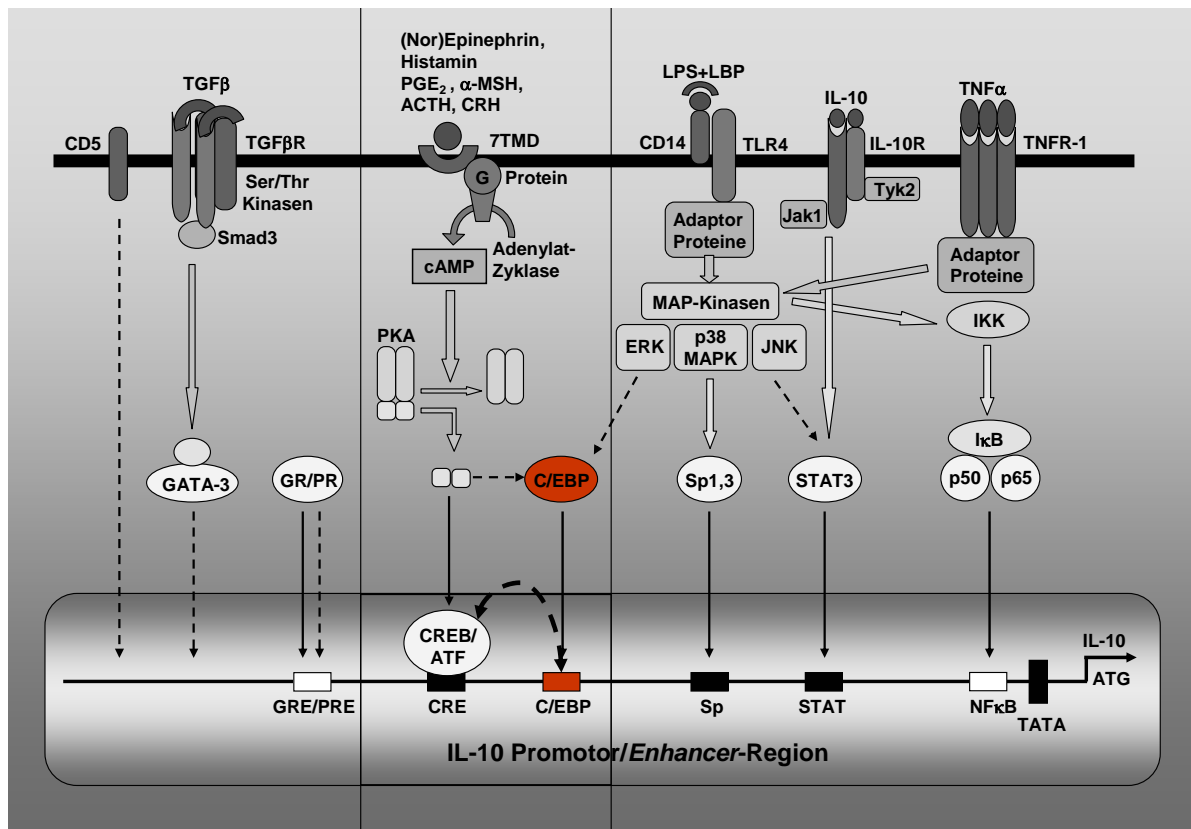
Die für eine IL-10 Promotoraktivierung essentielle CREB-C/EBP-Kooperation konnte im HL-60 Zellmodell gezeigt werden. Nicht nur die cAMP-abhängige, sondern auch die konstitutive Promotoraktivierung durch C/EBP ist von einer CREB-Phosphorylierung abhängig. Die cAMP/PKA-Signaltransduktion ist ein Mechanismus der in den meisten Zelltypen aktiviert werden kann, was bedeutet, dass die Phosphorylierung von CREB ubiquitär möglich ist. Die C/EBP-Expression kann also für die generelle Fähigkeit zur cAMP-abhängigen IL-10 Transkription einer Zelle limitierend sein. Dann können extrazelluläre Reize, die zum Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führen, die IL-10 Transkription nur aktivieren, wenn die Zelle Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie exprimiert.

Durch die Kooperation mit dem cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg ist C/EBP an der Stimulation der IL-10 Transkription über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die bei Ligandenbindung die Adenylatzyklase aktivieren, beteiligt. Mediatoren, die solche Rezeptoren benutzen, sind die Neurotransmitter Vasopressin,  $\beta$ -Endorphin, das *corticotropin-*

*releasing hormone*, das adreno-corticotrope Hormon, das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon und die Katecholamine. Sie werden bei der Aktivierung der hypothalamo-hypophysär-adrenergen Achse ausgeschüttet und sprechen für eine neuro-hormonelle Stimulation der IL-10 Transkription (Abb. 18) (Elenkov and Chrousos 1999, Elenkov et al. 2000, Elenkov 2002). Bei Myokardinfarktpatienten wurde gezeigt, dass die Plasmakonzentrationen von IL-10, Adrenalin und Noradrenalin miteinander korrelieren. Für diese Transmitter wurde die induzierende Wirkung auf die IL-10 Transkription über  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in C/EBP-exprimierenden Monozyten direkt nachgewiesen (Riese et al. 2000). Dass die neuro-hormonelle Immunmodulation eine wesentliche Rolle spielt, zeigt sich u. a. in der Tatsache, dass Hochleistungssportler vor Wettkämpfen und nach extremer physischer Aktivität eine stressbedingte Immunsuppression durch sympatho-adrenerge, cAMP-vermittelte Stimulation aufweisen. Eine Immundepression mit erhöhten IL-10 Werten ohne vorangehende systemische Inflammation wurde auch bei einer Patientengruppe nach Operationen an infratentoriellen Hirntumoren dokumentiert. Intraoperativ kam es bei diesen Patienten zu iatrogenen Hirnstammkompression mit Anstieg des systolischen Blutdruckes. Die Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems führte innerhalb von 4 bis 8 Stunden postoperativ über Katecholamine zur systemischen IL-10 Freisetzung, ohne dass ein Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine vorausgegangen war (Woiciechowsky et al. 1998). Eine solche sympatho-adrenerge Immundepression wurde auch bei Patienten mit geschlossenen Schädelhirntraumen beobachtet, die in 41% der Fälle eine Pneumonie innerhalb der ersten Woche posttraumatisch entwickelten (Hsieh et al. 1992). Die cAMP/PKA-Signaltransduktion spielt bei der stressbedingten IL-10 Expression eine entscheidende Rolle und ist damit eine Komponente in der neuro-hormonellen Immunmodulation (Platzer et al. 2000). Durch die erforderliche Kooperation von C/EBP-Transkriptionsfaktoren mit CREB bei der stressinduzierten cAMP/PKA-Signaltransduktion ist die Sensitivität gegenüber der neuro-hormonellen Immunmodulation zell-, differenzierungs- und gewebsspezifisch.

Bei einer Entzündungsreaktion werden Gewebsfaktoren wie Histamin und Prostaglandin  $E_2$  freigesetzt, die ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Adenylatzyklase aktivieren können. In der Leber sezernieren Kupffer-Zellen Prostaglandin  $E_2$  (Knolle et al. 1998a, Knolle et al. 1998b) und erhöhen auto- und parakrin die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Es ist schon länger bekannt, dass der protektive Effekt von cAMP vor endotoxin-induziertem, inflammatorischen Leberschaden durch IL-10 vermittelt wird (Arai et al. 1995). Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse lässt sich nun darauf schließen, dass eine

cAMP-abhängige IL-10 Transkription in diesem Organ vorliegt, die durch die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie in Leberzellen verstärkt wird.



**Abb. 18: Ergänzter Überblick der Signaltransduktionsmechanismen, die an der IL-10 Transkription beteiligt sind** (nach Platzter 2003). Gestrichelte Pfeile stehen für hypothetische, während durchgezogene Pfeile bereits bestätigte Beziehungen angeben. Weiße Rechtecke entsprechen bereits bekannten TFBS, für die jedoch keine funktionellen Analysen vorliegen. Schwarze Rechtecke symbolisieren TFBS, die bereits funktionell getestet wurden. ACTH, adreno-corticotropes Hormon; CRH, corticotropin-releasing hormone; ERK, extracellular signal regulated kinase; GR/PR, Glukokortikoid/Progesteron-Rezeptor; IKK, IκB-Kinase; Jak, Janus-Kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LPB, LPS-bindendes Protein; MSH, Melanozyten-stimulierendes Hormon; PGE, Prostaglandin E; R, Rezeptor; Ser/Thr, Serin/Threonin; Sp, stimulating protein, TLR, toll-like Rezeptor; TMR, Transmembranomänen; Tyk, Tyrosin-Kinase.

### 6.2.2. Die Bedeutung der Interaktionen von C/EBP mit anderen Transkriptionsfaktoren bei Stress und Entzündung

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Aufklärung der IL-10 Genregulation. Die Identifizierung von C/EBP-Motiven in der IL-10 Promotor/Enhancer-Region ermöglicht die Analyse von Interaktionen mit anderen Signaltransduktionswegen (Abb. 18). Zum Beispiel ist eine C/EBP-Phosphorylierung durch die *extracellular signal regulated kinase* und andere MAP-Kinasen denkbar (Mahoney et al. 1992). Damit könnte C/EBP auch in die inflammatorische LPS-abhängige IL-10 Induktion involviert sein. Auch eine Interaktion von C/EBP mit der NFκB-Signaltransduktion wurde bereits für die Induktion von IL-6 und IL-8 beschrieben (Akira and Kishimoto 1997). Die Transkriptionsfaktoren können funktionell und physisch, sowohl synergistisch als auch inhibitorisch interagieren, wenn ihre Motive eine

enge Lagebeziehung haben. Am humanen CMV IE1/2 Promotor/*Enhancer* wurde bereits gezeigt, dass C/EBP durch eine Komplexbildung mit NK $\kappa$ B/p65 die Induktion durch TNF $\alpha$  hemmt (Prosch et al. 2001). Genauso gut ist also eine Hemmung der entzündlichen IL-10 Induktion durch C/EBP auf dieser Ebene möglich.

Bei der hepatischen Aktivierung von Genen für Akute-Phase-Proteine wurden Wechselwirkungen von C/EBP mit STAT, insbesondere STAT3, 5 und 6 beobachtet (Akira and Kishimoto 1997). In der kolorektalen Karzinomzelllinie CaCo2 kann die C/EBP $\beta$ -Expression durch IL-10 über STAT3 aktiviert werden (Robb et al. 2002), so dass hier für die IL-10 Regulation direkte und indirekte Interaktionen zwischen der STAT3-Signaltransduktion und C/EBP vermutet werden können.

Des weiteren sind zwischen dem Glukokortikoid-Rezeptor und dem Transkriptionsfaktor C/EBP sowohl synergistische als auch hemmende Protein-Protein-Wechselwirkungen bekannt (Akira and Kishimoto 1997). Ein putatives GRE (*Glucocorticoid Responsive Element*) wurde 350 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes in der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region *in vitro* bereits gefunden (S. Prösch, persönliche Mitteilung). Vorläufige Reporterstudien haben ergeben, dass sowohl Dexamethason als auch Progesteron die cAMP-stimulierte Aktivierung der IL-10 Transkription in differenzierten Monozyten synergistisch verstärken können (unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Daten deuten mögliche Interaktionen zwischen CREB, C/EBP und dem Glukokortikoid- bzw. Progesteron-Rezeptor und damit eine eventuelle Beteiligung von C/EBP an der hormonellen IL-10 Induktion bei Stress bzw. bei Schwangerschaft an. Bei der stressbedingten Aktivierung der hypothalamo-hypophysär-adrenergen Achse werden nicht nur Katecholamine aus dem Nebennierenmark, sondern auch Glukokortikoide aus der Rinde des Organs freigesetzt. Sollte sich die synergistische Aktivierung der IL-10 Transkription durch Glukokortikoide bei sympatho-adrenerger Stimulation bestätigen (Elenkov et al. 1996), so ist die prophylaktische und therapeutische Gabe von Dexamethason bei Hirnschwellung mit resultierender Immundepression neu zu überdenken. Aus den vorläufigen Reporterstudien geht hervor, dass Glukokortikoide allein die IL-10 Transkription in Monozyten nicht aktivieren können. Deshalb wäre es vermutlich bei Patienten mit Hirnstammkompression und gleichzeitiger Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems vorteilhaft, die Ausschwemmung eines Hirnödems auf osmotische Diuretika wie Sorbit und Mannitol zu beschränken, um ein zentrales anti-inflammatorisches Syndrom durch Dexamethason-Gaben nicht zu verstärken.

### 6.3. Die IL-10 Therapie, ein Anlass zu Hoffnung?

Da relativer IL-10 Mangel bzw. Überschuss eine pathophysiologische Bedeutung haben kann, wird nach Therapien gesucht, die lokale oder systemische IL-10 Konzentrationen beeinflussen.

#### 6.3.1. Die Bedeutung von Polymorphismen

Polymorphismen sind Mutationen die sich bei mindestens einem Prozent der Population etabliert haben. Da interindividuelle Unterschiede bei der Expression von Zytokinen genetisch bedingt sein können, wird auch in den regulatorischen Bereichen des IL-10 Gens nach Polymorphismen gesucht. In der 5' regulatorischen Region des IL-10 Gens wurden mehrere Polymorphismen gefunden (Eskdale and Gallagher 1995, Turner et al. 1997, Haukim et al. 2002), darunter Längenpolymorphismen innerhalb von CA-reichen Regionen (*CA-repeats*) und Polymorphismen einzelner Nukleotide. Für drei Kombinationen von drei Einzelnukleotidpolymorphismen (Haplotypen) ist eine veränderte IL-10 Expression beschrieben (Turner et al. 1997). Einer der Einzelnukleotidpolymorphismen betrifft in der Position 852 bp stromaufwärts des Translationsstartes eine Base des C/EBP1-Motivs. Hier kann sowohl die Base Cytosin als auch Thymin stehen. Das C/EBP1-Motiv hat einen vergleichsweise geringen Anteil an der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Aktivierung und der alleinige Einfluss des Polymorphismus dieses Motivs auf die IL-10 Expression müsste noch experimentell geprüft werden. Innerhalb verschiedener Haplotypen ist Thymin mit reduzierter und Cytosin mit sowohl reduzierter als auch verstärkter IL-10 Expression assoziiert. Der Austausch einer Base ist sicher nicht maßgeblich bestimmend für eine alterierte Expression, jedoch kann er im Zusammenspiel mit anderen Faktoren eine Bedeutung erlangen. Viele Studien suchen nach einer Assoziation zwischen Polymorphismen, veränderter Zytokinexpression und verschiedenen Krankheiten, um pathophysiologische Mechanismen besser zu verstehen und Prädispositionsmarker sowie therapeutische Ansätze zu finden. Im Falle von IL-10 ließen sich verschiedene Haplotypen der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Region mit systemischem Lupus erythematoses, rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie Transplantatabstoßung assoziieren. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass diese Erkrankungen meist multifaktorieller Genese sind und daher solche Assoziationsstudien zwar der Suche nach Kandidatengenen dienen, jedoch nicht erschöpfend für ihr Verständnis sein können.

### 6.3.2. Eine Bewertung direkter und indirekter IL-10 Therapieformen

Da die komplexe Genregulation der meisten Zytokine sowie die Pathogenese vieler Immunerkrankungen noch nicht hinreichend verstanden ist, verlaufen Therapien mit Zytokinen sehr unterschiedlich. In der Dermatologie ist IL-10 als Therapeutikum eher viel versprechend, während andere immunologische Systemerkrankungen eine Therapie-Resistenz zeigen. Bei Psoriasis konnten in zwei unabhängigen klinischen Studien erfreulicherweise mit der IL-10 Therapie Erfolge verzeichnet werden. Subkutane IL-10 Applikationen reduzierten die psoriatischen Areale bei nahezu allen Patienten um 50-60% (Reich et al. 1998, Asadullah et al. 1999, Reich et al. 2001). Auch die Wirkung der bereits erfolgreich eingesetzten Lichttherapie scheint zum Teil indirekt auf einer verstärkten IL-10 Expression zu beruhen. UV B-Strahlung erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration, indem sie Prostaglandin E<sub>2</sub>, das *corticotropin-releasing hormone* und das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon induziert (Asadullah et al. 1998).

Beim systemischen Lupus erythematoses korrelieren die Serumkonzentrationen von IL-10 mit dem Erkrankungsgrad. Die Stimulation der Antikörperproduktion von B-Zellen durch IL-10 spielt eine wesentliche Rolle bei diesem Krankheitsbild. Bereits in einem Mausmodell konnte die Gabe von anti-IL-10-Antikörpern die auto-Antikörperproduktion und die Immunkomplexbildung wesentlich senken (Llorente et al. 1995). Eine jüngere Patientenstudie konnte eine andauernde Wirkung des Antikörpers gegen humanes IL-10 nachweisen (Llorente et al. 2000), so dass IL-10 Antagonisten bei der Therapie des systemischen Lupus erythematoses in Zukunft größere Bedeutung zukommen dürften.

Für die Therapie der rheumatoiden Arthritis ist IL-10 aufgrund seiner anti-inflammatorischen und matrix-protektiven Wirkung ebenfalls von Interesse. Im Speziellen hemmt IL-10 die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9. Der therapeutische Erfolg von Methotrexat, Iloprost oder Rolipram wird zum Teil auf die IL-10 Induktion durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zurückgeführt (Ross et al. 1997, Seitz et al. 2001, Gao et al. 2002). Im Tiermodell erreichte man durch die direkte IL-10 Applikation viel versprechende Resultate, die sich leider in Patientenstudien nicht bestätigen konnten (St Clair 1999, Moore et al. 2001, Neumann et al. 2002). Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn das Zytokin noch während der frühen Erkrankungsphase verabreicht wurde und wenn der zuverlässige Transport zum Ort der Entzündung gewährleistet war.

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen blieb der nach der IL-10-„Knockout“-Maus erwartete Erfolg einer Therapie mit rekombinantem IL-10 aus. Eine tägliche Dosis bis zu 20 µg/kg Körpergewicht wurde bei wenigen Nebenwirkungen zwar gut toleriert, jedoch

blieb die Erfolgsrate unter 50% (25% in der Placebogruppe) (van Deventer et al. 1997, Schreiber et al. 2000, Herfarth and Scholmerich 2002). Inzwischen vermutet man, dass nicht ein IL-10 Mangel, sondern eine gestörte IL-10 Signaltransduktion oder andere Faktoren pathogenetisch bedeutsam sind (Lovato et al. 2003). Kürzlich wurde in T-Zellen von Morbus Crohn Patienten eine erhöhte STAT3-Phosphorylierung und SOCS3 Expression dokumentiert. STAT3 und SOCS3 sind als Komponenten eines negativen *Feedback*-Mechanismus von IL-10 sowie von pro-inflammatorischen Zytokinen bekannt: SOCS3 wird von phosphoryliertem STAT3 induziert und hemmt die Janus-Kinase-Aktivität, so dass wiederum die Phosphorylierung von STAT3 verhindert wird. Die erhobenen Patientendaten können einen Hinweis auf die Störung dieser Autoregulation geben, wobei es zu einer Verstärkung der pro-inflammatorischen Signaltransduktion kommt. Man sollte jedoch nicht aus den Augen verlieren, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen phänotypische Diagnosen sind, die der Hetero- und Polygenie des Krankheitsbildes nicht gerecht werden. Es mag durchaus sein, dass einem Teil des Patientenkollektives mit der Gabe von rekombinantem IL-10 geholfen werden kann, wenn die pharmakodynamischen Voraussetzungen zur Applikation gegeben sind, während bei anderen der Erfolg ausbleibt.

Wachstumsfaktoren für Granulozyten und Makrophagen GM-CSF und G-CSF werden unter dem Handelsnamen Leukomax<sup>®</sup> und Neupogen<sup>®</sup> zur Behandlung von Neutropenien unter Chemotherapie eingesetzt. Darüber hinaus haben sie immunmodulatorische Eigenschaften (Hartung 1999) und sind dafür bekannt, dass sie postoperativen Komplikationen vorbeugen, indem sie die Immunabwehr gegen Mikroorganismen stärken und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine reduzieren (Lundblad et al. 1995, Lundblad et al. 1996). Diese Arbeit legt nahe, dass sie durch ihre differenzierende Wirkung mit zunehmender C/EBP-Expression in Zielzellen zusätzlich die Sensitivität der entzündlichen und stressvermittelten cAMP-abhängigen IL-10 Expression verstärken.

In verschiedenen Tiermodellen wurde bereits die IL-10 Genterapie bei Lebertransplantationen getestet. Intraportale Injektion oder Prä-Implantationstransduktion des Transplantates mit Vektoren für virales IL-10 haben die Abstoßungsrate signifikant reduziert (Shinozaki et al. 1999, Fujisawa et al. 2003). Die Expression von humanem IL-10 in einem Rattenlebertransplantat konnte die Abstoßung mit einer Effektivität, die mit der von Cyclosporin A vergleichbar war, verhindern (Hong et al. 2003). Bei einer IL-10 Genterapie ist jedoch zu beachten, dass durch die IL-10 Wirkung Viren reaktiviert werden können. Bei Patienten, die sich wegen ausgedehntem Leberschaden aufgrund einer Hepatitis C Virusinfektion, einer Transplantation unterziehen müssen, kommt es beinahe immer zur

Virusreaktivierung durch die IL-10 Produktion des Transplantates. Dabei korrelieren die postoperativen IL-10 Werte mit dem Ausmaß von Virusreaktivierung und Gewebeschädigung (Sheiner et al. 2001).

Zur Erschließung der klinischen Wirkungen von IL-10 machen sich weitere Untersuchungen notwenig. Es deutet sich bereits an, dass IL-10 eher prophylaktisches als kuratives Potential in der Therapie von pathologischen Immunreaktionen hat. Die unterschiedlichen Erfolgsraten IL-10-assoziiierter Therapien sind zum Teil der Komplexität der behandelten Krankheiten, der Interferenz mit anderen Therapien sowie der heterogenen Disposition der Patientenkollektive geschuldet. Eine detaillierte Aufklärung der molekularen Mechanismen der Expression von IL-10 ist eine Voraussetzung für die Analyse individueller Dysregulation und die Entwicklung von individualisierten Therapien.



## **7. SCHLUSSFOLGERUNGEN**

Die hier vorliegende Arbeit liefert wesentliche Erkenntnisse zum Verständnis der IL-10 Promotor/*Enhancer*-Struktur und -Funktion. Im Detail konnten Antworten auf alle Fragen, die sich vor Beginn meiner Untersuchungen stellten, gefunden werden. Jedoch ergeben sich daraus weitere Fragen. Die Aufklärung der Kooperationsmechanismen von C/EBP und CREB bei der konstitutiven und cAMP-stimulierten IL-10 Transkription ist das Ziel zukünftiger Untersuchungen, die auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauen können. Darüber hinaus können denkbare Interaktionen von C/EBP mit anderen Signaltransduktionsmechanismen bei der IL-10 Transkription in differenzierten Monozyten und anderen Zellen näher betrachtet werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte bei der Untersuchung der IL-10 Expression anderer Zellen zukünftig auch deren C/EBP-Gehalt berücksichtigt werden.

Die Beteiligung von C/EBP an der cAMP-abhängigen IL-10 Transkription ist ein Beispiel für die Spezifität der Genregulation durch Kombination verschiedener Faktoren: Ubiquitäre Signaltransduktionsmechanismen können durch Interaktionen mit akzessorischen Faktoren moduliert werden. Dadurch wird bei gleichem extrazellulärem Reiz die Expression jeweils anderer Gene in verschiedenen Zellen ermöglicht.

Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, dass bei Interaktionen zwischen dem Immun-, Hormon- und dem vegetativen Nervensystem die Differenzierung von Monozyten eine Bedeutung haben kann. Es bleibt jedoch zu vermerken, dass lediglich ein kleiner Ausschnitt der IL-10 Genregulation näher beleuchtet wurde. Die verwendeten Untersuchungsmodelle zogen andere Zellen oder gar Zellverbände sowie die translationale und post-translationale Regulation nicht in Betracht.

Um IL-10 assoziierte pathophysiologische Mechanismen besser verstehen können, sind die Ergebnisse im Kontext anderer und vor allem zukünftiger Arbeiten zu sehen, denn nur die gleichzeitige Betrachtung möglichst vieler am Prozess beteiligter Faktoren und deren genetische Variation kann ein Erfolg versprechender Ansatz zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte sein.

## 8. QUELLENVERZEICHNIS

Akira S, Kishimoto T. 1997. NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol*, 65(1-46).

Alberts AS, Arias J, Hagiwara M, Montminy MR, Feramisco JR. 1994. Recombinant cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylated on Ser-133 is transcriptionally active upon its introduction into fibroblast nuclei. *J Biol Chem*, 269(10): 7623-7630.

Arai T, Hiromatsu K, Kobayashi N, Takano M, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. 1995. IL-10 is involved in the protective effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on endotoxin-induced inflammatory liver injury. *J Immunol*, 155(12): 5743-5749.

Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk HD, Docke WD. 1998. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest*, 101(4): 783-794.

Asadullah K, Docke WD, Ebeling M, Friedrich M, Belbe G, Audring H, Volk HD, Sterry W. 1999. Interleukin 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase 2 trial. *Arch Dermatol*, 135(2): 187-192.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev*, 55(2): 241-269.

Baehr RV, Volk HD, Reinke P, Falck P, Wolff H. 1989. An immune monitoring program for controlling immunosuppressive therapy. *Transplant Proc*, 21(1 Pt 1): 1189-1191.

Bakker O, Parker MG. 1991. CAAT/enhancer binding protein is able to bind to ATF/CRE elements. *Nucleic Acids Res*, 19(6): 1213-1217.

Barsig J, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G, Wendel A. 1995. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*, 25(10): 2888-2893.

Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. 2000. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol*, 165(3): 1612-1617.

Berrier A, Siu G, Calame K. 1998. Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells. *J Immunol*, 161(5): 2267-2275.

Blokzijl A, ten Dijke P, Ibanez CF. 2002. Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Curr Biol*, 12(1): 35-45.

Bondeson J, Browne KA, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. 1999. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages:

lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *J Immunol*, 162(5): 2939-2945.

Bone RC. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, 24(7): 1125-1128.

Brenner S, Prosch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C. 2003. cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem*, 278(8): 5597-5604.

Brightbill HD, Plevy SE, Modlin RL, Smale ST. 2000. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J Immunol*, 164(4): 1940-1951.

Bromberg JS. 1995. IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr Opin Immunol*, 7(5): 639-643.

Buelens C, Willems F, Delvaux A, Pierard G, Delville JP, Velu T, Goldman M. 1995. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol*, 25(9): 2668-2672.

Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S. 1994. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med*, 179(5): 1695-1699.

Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, Marchi M, Suzuki R, Suzuki A, Yoshimura A. 1999. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood*, 94(8): 2880-2889.

Cavaillon JM. 2001. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47(4): 695-702.

Chen WF, Zlotnik A. 1991. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol*, 147(2): 528-534.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 174(4): 915-924.

Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. 1991. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest*, 88(1): 346-350.

Denys A, Udalova IA, Smith C, Williams LM, Ciesielski CJ, Campbell J, Andrews C, Kwiatkowski D, Foxwell BM. 2002. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. *J Immunol*, 168(10): 4837-4845.

Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. 1996. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians*, 108(5): 374-381.

Elenkov IJ, Chrousos GP. 1999. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab*, 10(9): 359-368.

- Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL. 2000. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*, 917(94-105).
- Elenkov IJ. 2002. Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications. *Int Rev Neurobiol*, 52(163-186).
- Emmanuilidis K, Weighardt H, Maier S, Gerauer K, Fleischmann T, Zheng XX, Hancock WW, Holzmann B, Heidecke CD. 2001. Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J Immunol*, 167(7): 3919-3927.
- Erickson RL, Hemati N, Ross SE, MacDougald OA. 2001. p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem*, 276(19): 16348-16355.
- Eskdale J, Gallagher G. 1995. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. *Immunogenetics*, 42(5): 444-445.
- Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. 2002. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol*, 23(2): 89-96.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6): 2081-2095.
- Fry CJ, Farnham PJ. 1999. Context-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 274(42): 29583-29586.
- Fujisawa K, Saito S, Okada Y, Fujiwara T, Yagi T, Iwagaki H, Tanaka N. 2003. Suppression of allogeneic response by viral IL-10 gene transfer. *Cell Transplant*, 12(4): 379-387.
- Gao IK, Scholz P, Boehme MW, Norden C, Lemmel EM. 2002. A 7-day oral treatment of patients with active rheumatoid arthritis using the prostacyclin analog iloprost: cytokine modulation, safety, and clinical effects. *Rheumatol Int*, 22(2): 45-51.
- Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. 2002. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*, 100(13): 4537-4543.
- Grassl C, Luckow B, Schlondorff D, Dendorfer U. 1999. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 10(7): 1466-1477.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*, 184(1): 19-29.
- Guo S, Cichy SB, He X, Yang Q, Ragland M, Ghosh AK, Johnson PF, Unterman TG. 2001. Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta. *J Biol Chem*, 276(11): 8516-8523.
- Habener JF. 1990. Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors. *Mol Endocrinol*, 4(8): 1087-1094.
- Haddad JJ, Fahlman CS. 2002. Redox- and oxidant-mediated regulation of interleukin-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? *Biochem Biophys Res Commun*, 297(2): 163-176.
- Hartung T. 1999. Immunomodulation by colony-stimulating factors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 136(1-164).

- Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. 2002. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes Immun*, 3(6): 313-330.
- Herfarth H, Scholmerich J. 2002. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroads. Treatment of Crohn's disease with the anti-inflammatory cytokine interleukin 10. *Gut*, 50(2): 146-147.
- Hong IC, Mullen PM, Precht AF, Khanna A, Li M, Behling C, Lopez VF, Chiou HC, Moss RB, Hart ME. 2003. Non-viral human IL-10 gene expression reduces acute rejection in heterotopic auxiliary liver transplantation in rats. *Microsurgery*, 23(5): 432-436.
- Hsieh AH, Bishop MJ, Kubilis PS, Newell DW, Pierson DJ. 1992. Pneumonia following closed head injury. *Am Rev Respir Dis*, 146(2): 290-294.
- Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW. 1990. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science*, 250(4982): 830-832.
- Ishizaka S, Saito S, Yoshikawa M, Kimoto M, Nishiyama T. 1996. IL-10 production in mouse hepatocytes augmented by TGF-beta. *Cytokine*, 8(11): 837-843.
- Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Larner AC, Finbloom DS. 1999. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93(5): 1456-1463.
- Jahr H, Wolff H. 1989. [The liver--an immunologically privileged organ?]. *Allerg Immunol (Leipz)*, 35(3): 155-166.
- Janeway CA Travers P Walport M, Capra JD. 1999. Immunobiology - The immune system in health and disease. Fourth Edition. New York, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1-260.
- Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW, Golub TR, Tenen DG. 2001. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol*, 21(11): 3789-3806.
- Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA. 1999. Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol*, 162(5): 2457-2461.
- Knolle P, Lohr H, Treichel U, Dienes HP, Lohse A, Schlaack J, Gerken G. 1995a. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol*, 33(10): 613-620.
- Knolle P, Schlaack J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. 1995b. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol*, 22(2): 226-229.
- Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Loser E, Schmitt E, Gerken G, Lohse AW. 1998a. IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol*, 114(3): 427-433.
- Knolle PA, Uhrig A, Protzer U, Trippler M, Duchmann R, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. 1998b. Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology*, 27(1): 93-99.

- Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. 1997. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity*, 7(6): 861-871.
- Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. 2000. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med*, 26 Suppl 1(S124-128).
- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. 1995. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*, 96(5): 2304-2310.
- Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, 273(44): 28545-28548.
- Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA. 1997. In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest*, 100(10): 2443-2448.
- Levy Y, Brouet JC. 1994. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest*, 93(1): 424-428.
- Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. 1993. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20): 9606-9610.
- Lin TJ, Befus AD. 1997. Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor. *J Immunol*, 159(8): 4015-4023.
- Liu TF, Jones BM. 1998a. Impaired production of IL-12 in system lupus erythematosus. II: IL-12 production in vitro is correlated negatively with serum IL-10, positively with serum IFN-gamma and negatively with disease activity in SLE. *Cytokine*, 10(2): 148-153.
- Liu TF, Jones BM. 1998b. Impaired production of IL-12 in systemic lupus erythematosus. I. Excessive production of IL-10 suppresses production of IL-12 by monocytes. *Cytokine*, 10(2): 140-147.
- Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Morel-Fourrier B, Brouet JC, Alarcon-Segovia D, Galanaud P, et al. 1995. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, 181(3): 839-844.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Couderc J, Alarcon-Segovia D, Ruiz-Soto R, Alcocer-Castillejos N, Alcocer-Varela J, Granados J, Bahena S, Galanaud P, Emilie D. 1997. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 40(8): 1429-1435.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Garcia-Padilla C, Claret E, Jakez-Ocampo J, Cardiel MH, Alcocer-Varela J, Grangeot-Keros L, Alarcon-Segovia D, Wijdenes J, Galanaud P, Emilie D. 2000. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 43(8): 1790-1800.
- Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Odum N. 2003. Constitutive Stat3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem*,

- Lundblad R, Wang MY, Kvalheim G, Lingaas E, Giercksky KE. 1995. Granulocyte colony-stimulating factor improves myelopoiesis and host defense in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Shock*, 4(1): 68-73.
- Lundblad R, Nesland JM, Giercksky KE. 1996. Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Crit Care Med*, 24(5): 820-826.
- Ma W, Lim W, Gee K, Aucoin S, Nandan D, Kozlowski M, Diaz-Mitoma F, Kumar A. 2001. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem*, 276(17): 13664-13674.
- Mahoney CW, Shuman J, McKnight SL, Chen HC, Huang KP. 1992. Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J Biol Chem*, 267(27): 19396-19403.
- Mayr B, Montminy M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(8): 599-609.
- McKnight SL. 2001. McBindall--a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell*, 107(3): 259-261.
- Metz R, Ziff E. 1991. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev*, 5(10): 1754-1766.
- Minguela A, Torio A, Marin L, Muro M, Villar LM, Diaz J, Ramirez P, Parrilla P, Garcia-Alonso AM, Alvarez-Lopez MR. 1999. Implication of soluble and membrane HLA class I and serum IL-10 in liver graft acceptance. *Hum Immunol*, 60(6): 500-509.
- Mink S, Haenig B, Klempnauer KH. 1997. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol*, 17(11): 6609-6617.
- Montminy M. 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem*, 66(807-822).
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19(683-765).
- Mori N, Prager D. 1997. Activation of the interleukin-10 gene in the human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF-kappa B binding sites in the regulatory region of the interleukin-10 gene. *Eur J Haematol*, 59(3): 162-170.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7): 2348-2357.
- Muller C, Alunni-Fabbroni M, Kowenz-Leutz E, Mo X, Tommasino M, Leutz A. 1999. Separation of C/EBPalpha-mediated proliferation arrest and differentiation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13): 7276-7281.
- Nerlov C, Ziff EB. 1994. Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev*, 8(3): 350-362.
- Nerlov C, Ziff EB. 1995. CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *Embo J*, 14(17): 4318-4328.

- Neumann E, Judex M, Kullmann F, Grifka J, Robbins PD, Pap T, Gay RE, Evans CH, Gay S, Scholmerich J, Muller-Ladner U. 2002. Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. *Gene Ther*, 9(22): 1508-1519.
- Niiro H, Otsuka T, Tanabe T, Hara S, Kuga S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Kitajima S, Abe M, et al. 1995. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood*, 85(12): 3736-3745.
- O'Garra A, Arai N. 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*, 10(12): 542-550.
- Pedersen TA, Kowenz-Leutz E, Leutz A, Nerlov C. 2001. Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev*, 15(23): 3208-3216.
- Pelletier N, Boudreau F, Yu SJ, Zannoni S, Boulanger V, Asselin C. 1998. Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*, 439(3): 275-280.
- Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. 2000. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol*, 109(1): 30-33.
- Platzer C, Volk HD, Platzer M. 1994. 5' noncoding sequence of human IL-10 gene obtained by oligo-cassette PCR walking. *DNA Seq*, 4(6): 399-401.
- Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD. 1995. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol*, 7(4): 517-523.
- Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prosch S. 1999. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol*, 29(10): 3098-3104.
- Platzer C, Docke W, Volk H, Prosch S. 2000. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol*, 105(1): 31-38.
- Platzer C. 2003. Interleukin-10: An anti-inflammatory and immunosuppressive cytokine in normal and pathological immune response. *Curr Med Chem*, 2(4): 309-323.
- Prosch S, Heine AK, Volk HD, Kruger DH. 2001. CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta negatively influence the capacity of tumor necrosis factor alpha to up-regulate the human cytomegalovirus IE1/2 enhancer/promoter by nuclear factor kappaB during monocyte differentiation. *J Biol Chem*, 276(44): 40712-40720.
- Reich K, Bruck M, Grafe A, Vente C, Neumann C, Garbe C. 1998. Treatment of psoriasis with interleukin-10. *J Invest Dermatol*, 111(6): 1235-1236.
- Reich K, Garbe C, Blaschke V, Maurer C, Middel P, Westphal G, Lippert U, Neumann C. 2001. Response of psoriasis to interleukin-10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation. *J Invest Dermatol*, 116(2): 319-329.



- Rennick DM, Fort MM. 2000. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10<sup>-/-</sup>) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(6): G829-833.
- Riese U, Brenner S, Docke WD, Prosch S, Reinke P, Oppert M, Volk HD, Platzer C. 2000. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol Cell Biochem*, 212(1-2): 45-50.
- Robb BW, Hershko DD, Paxton JH, Luo GJ, Hasselgren PO. 2002. Interleukin-10 activates the transcription factor C/EBP and the interleukin-6 gene promoter in human intestinal epithelial cells. *Surgery*, 132(2): 226-231.
- Roesler WJ, Graham JG, Kolen R, Klemm DJ, McFie PJ. 1995. The cAMP response element binding protein synergizes with other transcription factors to mediate cAMP responsiveness. *J Biol Chem*, 270(14): 8225-8232.
- Roesler WJ, Park EA, McFie PJ. 1998. Characterization of CCAAT/enhancer-binding protein alpha as a cyclic AMP-responsive nuclear regulator. *J Biol Chem*, 273(24): 14950-14957.
- Roesler WJ. 2000. What is a cAMP response unit? *Mol Cell Endocrinol*, 162(1-2): 1-7.
- Roesler WJ. 2001. The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression. *Annu Rev Nutr*, 21(141-165).
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. 2001a. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*, 182(68-79).
- Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. 2001b. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med*, 193(2): F5-9.
- Ross SE, Williams RO, Mason LJ, Mauri C, Marinova-Mutafchieva L, Malfait AM, Maini RN, Feldmann M. 1997. Suppression of TNF-alpha expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen-induced arthritis by rolipram. *J Immunol*, 159(12): 6253-6259.
- Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr. 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*, 274(45): 31868-31874.
- Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. 2000. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology*, 119(6): 1461-1472.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol*, 59(4): 555-561.
- Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*, 80(7): 1725-1735.
- Seitz M, Zwicker M, Wider B. 2001. Enhanced in vitro induced production of interleukin 10 by peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis is associated with clinical response to methotrexate treatment. *J Rheumatol*, 28(3): 496-501.
- Sheiner PA, Florman SS, Emre S, Fishbein T, Schwartz ME, Miller CM, Boros P. 2001. Recurrence of hepatitis C after liver transplantation is associated with increased systemic IL-10 levels. *Mediators Inflamm*, 10(1): 37-41.

- Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, Sakaguchi T, Ito H, Dohi K. 1999. Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. *Gene Ther*, 6(5): 816-822.
- Slomiany BA, D'Arigo KL, Kelly MM, Kurtz DT. 2000. C/EBPalpha inhibits cell growth via direct repression of E2F-DP-mediated transcription. *Mol Cell Biol*, 20(16): 5986-5997.
- St Clair EW. 1999. Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58 Suppl 1(I99-I102).
- Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*, 99(7): 2468-2476.
- Tae HJ, Zhang S, Kim KH. 1995. cAMP activation of CAAT enhancer-binding protein-beta gene expression and promoter I of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 270(37): 21487-21494.
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10(1): 39-49.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, 90(2): 489-519.
- Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. 2000. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol*, 165(1): 286-291.
- Tsukada J, Saito K, Waterman WR, Webb AC, Auron PE. 1994. Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol Cell Biol*, 14(11): 7285-7297.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24(1): 1-8.
- Umek RM, Friedman AD, McKnight SL. 1991. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*, 251(4991): 288-292.
- van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. 1997. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology*, 113(2): 383-389.
- Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. 1991. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(4): 1172-1176.
- Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, 246(4932): 911-916.
- Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, DeSmet JM, Vincent JL. 1997a. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J*, 133(3): 335-339.
- Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. 1997b. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*, 112(3): 676-692.

- Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. 1997c. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg*, 63(1): 269-276.
- Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. 2001. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*, 8(4): 817-828.
- Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. 1998. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 273(1): 302-308.
- Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. 1994. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*, 24(4): 1007-1009.
- Wilson HL, McFie PJ, Roesler WJ. 2001. Characterization of domains in C/EBPalpha that mediate its constitutive and cAMP-inducible activities. *Mol Cell Endocrinol*, 181(1-2): 27-34.
- Wilson HL, Roesler WJ. 2002. CCAAT/enhancer binding proteins: do they possess intrinsic cAMP-inducible activity? *Mol Cell Endocrinol*, 188(1-2): 15-20.
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schoning B, Glockner F, Lanksch WR, Volk HD, Docke WD. 1998. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med*, 4(7): 808-813.
- Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. 1995. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure*, 3(6): 591-601.
- Zidek Z. 1999. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw*, 10(3): 319-328.

## **9. ANHANG**

### **9. 1. Danksagung**

Allen voran möchte ich mich bei Frau Dr.rer.nat. Cornelia Platzer für die Überlassung eines so ergiebigen Themas, die Bereitstellung der Verbrauchsmaterialien sowie die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Ich habe von den anregenden Diskussionen und Herausforderungen besonders profitiert. Nicht zuletzt bin ich ihr für ihre Hilfestellung beim Feinschliff dieser Arbeit durch kritische Durchsicht und für ihren wissenschaftlichen Beistand in dieser Zeit dankbar.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr.med. habil. Karl-Jürgen Halbhuber für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie seine wissenschaftliche Unterstützung.

Für die kooperative Zusammenarbeit und die kritischen Diskussionen während meiner experimentellen Arbeit sowie für die unverzichtbare Durchführung der radioaktiven Experimente möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr.rer.nat. Susanna Prösch, vom Institut für Virologie der Charité der Humboldt Universität Berlin, bedanken.

Für die fruchtbare Zusammenarbeit möchte ich mich bei den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Frau Dr.rer.nat. Ulrike Riese und Frau M.sc. Katja Schenke-Layland bedanken. Für das ausdauernde Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich im Speziellen Frau Dr.rer.nat. Iris Riemann sehr dankbar. Mein Dank gilt darüber hinaus ebenso den MitarbeiterInnen des Institutes für Anatomie II der FSU Jena, die mich in moralischer und praktischer Hinsicht unterstützt haben.

Mein Dank gilt dem Förderverein des Klinikums der Universität Jena, der „Carl Zeiss“ Jena GmbH, dem Böhringer Ingelheim Fonds sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mir durch ihre Stipendien eine wirtschaftliche Grundlage verschafft und damit die intensive, experimentelle Bearbeitung meines Promotionsthemas ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei den lieben Menschen bedanken, die mich während dieser Zeit auch außerhalb des Labors in jeder Hinsicht unterstützten und es immer wieder verstanden haben, mich zu motivieren.

## **9. 2. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Die Dissertation habe ich selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts wurde ich von Frau Dr.rer.nat. Cornelia Platzer vom Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena unterstützt. Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, erhalten. Ich möchte hiermit noch einmal darauf hinweisen, dass die experimentellen Arbeiten mit radioaktiven Substanzen, die der Entstehung der Abb. 6 im Kapitel 5.1 zu Grunde liegen, von Frau PD Dr.rer.nat. Susanna Prösch im Isotopenlabor des Institutes für Virologie der Charité der Humboldt Universität Berlin durchgeführt wurden. Ich erkläre außerdem, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe. Jedoch ist ein Großteil der hier dargestellten Ergebnisse in eine Veröffentlichung im Journal of Biological Chemistry (8: 5597-5604) eingegangen.

Jena, den 19. Januar 2004

Susanne Brenner

### 9. 3. Lebenslauf

#### *Persönliche Daten*

---

Name: Susanne Brenner  
Geburtsdatum: 1. Februar 1979  
Geburtsort: Suhl  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

#### *Bildungsweg*

---

09/1985-09/1991	10. POS „Wilhelm Pieck“, Suhl
09/1991-09/1993	1. Staatliches Gymnasium, Suhl
09/1993-09/1998	Gymnasialteil der Kooperativen Gesamtschule, Erfurt
09/1995-09/1996	<i>Lycée Carnot</i> , Cannes/Frankreich
<b>1998</b>	<b>Erlangen der Hochschulreife</b>
10/1998	Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 01/2000	Mitarbeit am DFG-Projekt „Untersuchungen zur Regulation der Expression von Interleukin-10“ bei Frau Dr. Platzer, Institut für Anatomie II
<b>09/2000</b>	<b>Physikum</b>
10/2000-11/2002	experimentelle Arbeiten zur Promotion am Institut für Anatomie II der FSU Jena
<b>08/2002</b>	<b>1. Staatsexamen</b>
09/2002-10/2002	experimentelle Arbeiten im <i>Laboratoire d'Immunologie Cellulaire</i> , <i>Hôpital Pitié Salpêtrière</i> , Paris
07/2003-09/2003	Famulatur in Nikaragua
03/2003-12/2003	Anfertigung der Dissertationsschrift

---

**Stipendien**

---

seit 10/1998	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
10/2000-10/2001	“Carl Zeiss” Stipendium zur experimentellen Bearbeitung der Promotion
09/2002-10/2002	Stipendium des Böhringer Ingelheim Fonds für die Arbeit im <i>Laboratoire d’Immunologie Cellulaire, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris</i>

---

**Publikationen**

---

**Veröffentlichungen**

Riese U, **Brenner S**, Docke WD, Prosch S, Reinke P, Oppert M, Volk HD and Platzer C (2000) Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its Promotor in monocytic but not in T-cells. **Mol. Cell. Biochem** 212: 45-50.

**Brenner S**, Prosch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U and Platzer C (2003) cAMP-induced interleukin-10 Promotor activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. **J Biol Chem** 278: 5597-5604.

**Posterpräsentationen**

- 3<sup>rd</sup> Cellular and Molecular Biology World Congress, Jena, 08.-13. Oktober 2000, Session: Molecular Mechanism of Cellular Responses to Environmental Stressors
- 3<sup>rd</sup> International Workshop on IL-10 and related molecules, Berlin, 04.-07. April 2001

Jena, den 19. Januar 2003

Susanne Brenner